



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM MEL NACIONAL POR ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÓMICA

ANA FILIPA RAMOS PEREIRA EPIFÂNIO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

CO-ORIENTADORA

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

DETERMINAÇÃO DE METAIS PESADOS EM MEL NACIONAL POR ESPECTROMETRIA
DE ABSORÇÃO ATÓMICA

ANA FILIPA RAMOS PEREIRA EPIFÂNIO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

CO-ORIENTADORA

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

2012

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais pela educação exemplar que me deram, pelos valores e princípios que me transmitiram, e pelo amor incondicional. À minha irmã pelo carinho e amizade que nos une.

Ao meu marido, e melhor amigo, agradeço o amor e amizade partilhados ao longo destes anos, e agradeço o apoio e motivação constantes ao longo da minha vida académica.

À Professora Doutora Yolanda Vaz agradeço a dedicação e empenho atribuídos a este projeto e ao seu aconselhamento técnico e científico. À Dra. Belmira Carrapiço quero agradecer a orientação e apoio constantes.

À Engenheira Adriana Belas agradeço pelo apoio laboratorial e técnico ao longo de todo o trabalho experimental.

Agradeço ainda a todos aqueles que auxiliaram este projeto, na recolha de amostras de mel, nos trabalhos de laboratório realizados e nas diversas pesquisas efetuadas. Aos apicultores que colaboraram um obrigada pelo vosso interesse e paixão por esta arte agrícola, a apicultura.

RESUMO

Título: Determinação de metais pesados em mel nacional por espectrometria de absorção atómica

O mel é um alimento com reduzido teor em água e apresenta na sua composição uma complexa mistura de diferentes hidratos de carbono, assim como proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais. Possui propriedades antimicrobianas, antivirais, antiparasitárias, antioxidantes e anti-inflamatórias.

Atualmente, a produção de mel ocorre num ambiente potencialmente poluído devido à industrialização crescente. Os contaminantes emitidos para a atmosfera atingem as colmeias, as abelhas e o mel através da água, do ar, das plantas e do solo. Embora a ingestão de metais pesados através do mel seja reduzida, a sua bioacumulação no organismo pode resultar em toxicidade e pôr em causa a saúde pública.

Os objectivos deste trabalho são a optimização e validação do método espectrofotométrico de absorção atómica para detecção e quantificação de metais pesados (chumbo, cádmio e cobre) em amostras de mel nacional de diferentes origens geográficas e a comparação dos resultados obtidos nas diferentes regiões do país. As amostras, de diferentes origens geográficas, foram submetidas a um processo de digestão seca e a quantificação de metais pesados obtida por espectrometria de absorção atómica.

Analisaram-se 21 amostras, de 7 distritos de Portugal continental, quanto ao seu conteúdo em cobre e cádmio. A quantificação foi realizada por espectrometria de absorção atómica e os resultados obtidos para Cu foram: distrito de Setúbal $1,22 \pm 0,24$ ppm, distrito de Coimbra $0,73 \pm 0,28$ ppm, distrito de Santarém $0,71 \pm 0,89$ ppm, distrito de Castelo Branco $0,65 \pm 0,44$ ppm, distrito de Évora $0,58 \pm 0,35$ ppm, distrito de Beja $0,55 \pm 0,19$ ppm, distrito de Faro $0,34 \pm 0,28$ ppm. Enquanto que para Cd os resultados foram: distrito de Castelo Branco $0,23 \pm 0,06$ ppm, distrito de Setúbal $0,19 \pm 0,04$ ppm, distrito de Évora $0,14 \pm 0,15$ ppm, distrito de Coimbra $0,14 \pm 0,13$ ppm, distrito de Beja $0,07 \pm 0,06$ ppm, no distrito de Santarém e Faro as amostras apresentavam valores abaixo do limite de detecção. As amostras do distrito de Setúbal apresentaram a maior concentração em cobre, enquanto que o nível mais elevado de cádmio foi detectado nas amostras do distrito de Castelo Branco. No entanto os resultados obtidos indicam que o mel nacional é seguro para o consumidor quanto ao seu conteúdo em metais pesados.

Palavras-chave: Mel; contaminantes; metais pesados; espectrometria de absorção atómica.

ABSTRACT

Title: Determination of heavy metals in Portuguese honey by atomic absorption spectrometry

Honey is a food product with low water content and it has in its composition a complex mixture of different carbohydrates, as well as proteins, amino acids, vitamins and minerals. It possesses antimicrobial, antiviral, anti parasitic, antioxidant and anti-inflammatory properties.

Currently, honey production occurs in a potentially polluted environment due to growing industrialization. Contaminants emitted in the atmosphere reach the hives, bees and honey through water, air, plants and soil. Although heavy metal intake through honey is low, its bioaccumulation may result in toxicity and undermine health.

The aims of this work are the optimization and validation of atomic absorption spectrophotometric method for detection and quantification of heavy metals (lead, cadmium and copper) in honey samples from different national geographic areas; and the comparison of the obtained results between regions. Samples from different origins were subjected to a dry digestion process and the heavy metal quantification was performed by atomic absorption spectrometry.

This study analysed 21 samples from 7 Portuguese districts, as for their content in copper and cadmium. Quantification was determined using atomic absorption spectrometry and their content in copper were: Setúbal district $1,22 \pm 0,24$ ppm, Coimbra district $0,73 \pm 0,28$ ppm, Santarém district $0,71 \pm 0,89$ ppm, Castelo Branco district $0,65 \pm 0,44$ ppm, Évora district $0,58 \pm 0,35$ ppm, Beja district $0,55 \pm 0,19$ ppm, and $0,34 \pm 0,28$ ppm in Faro district. The content in cadmium were: $0,23 \pm 0,06$ ppm in Castelo Branco district, $0,19 \pm 0,04$ ppm in Setúbal district, $0,14 \pm 0,15$ ppm in Évora district, $0,14 \pm 0,13$ ppm in Coimbra district, $0,07 \pm 0,06$ ppm in Beja district, and concentrations below the detection limit in Santarém district and in Faro district. Setúbal samples showed the highest copper concentration levels, whereas the highest concentration levels of cadmium were detected in Castelo Branco district samples. However these results indicate that Portuguese national honey is safe for consumption as for their content in heavy metals.

Key words: Honey; contaminants, heavy metals, atomic absorption spectrometry.

INDICE GERAL

Capitulo - I. Introdução	1
1. O mel	1
1.1. Composição	1
1.2. Propriedades nutricionais e terapêuticas do mel	4
1.3. Enquadramento legislativo referente ao mel	5
1.4. Sector apícola nacional	7
2. A contaminação de mel por metais pesados	10
2.1. A poluição ambiental: uma fonte de contaminação	11
2.2. Contaminação de mel por metais pesados: outros fatores	14
2.3. Enquadramento legislativo e estudos de pesquisa referentes à presença de metais pesados em mel	15
3. Monitorização de resíduos em mel em Portugal e na União Europeia	17
4. Metodologias analíticas para deteção e determinação de contaminantes em mel	20
4.1. Espectrometria de absorção atómica	20
4.2. Espectrometria de emissão atómica	21
4.3. Validação de métodos quantitativos para deteção e quantificação de metais pesados	22
4.3.1. Exatidão	22
4.3.2. Precisão	22
4.3.3. Especificidade/Seletividade	23
4.3.4. Limite de Deteção	23
4.3.5. Limite de Quantificação	23
4.3.6. Linearidade	23
4.3.7. Gama de trabalho	24
5. Os metais pesados e o seu impacto na saúde pública	24
5.1. Chumbo	25
5.1.1. Fontes de exposição	25
5.1.2. Toxicocinética	25
5.1.2.1. Absorção e distribuição	25
5.1.2.2. Eliminação	26
5.1.3. Toxicidade	26
5.1.4. Legislação referente ao chumbo na alimentação	27
5.2. Cádmio	28
5.2.1. Fontes de exposição	29
5.2.2. Toxicocinética	29
5.2.2.1. Absorção e distribuição	29
5.2.2.2. Eliminação	30
5.2.3. Toxicidade	30
5.2.4. Legislação referente ao cádmio na alimentação	32
5.3. Cobre	32
5.3.1. Fontes de exposição	33
5.3.2. Toxicocinética	33
5.3.2.1. Absorção e distribuição	33
5.3.2.2. Eliminação	34
5.3.3. Toxicidade	34
5.3.4. Legislação referente ao cobre na alimentação	36

Capítulo - II. Projeto Experimental.....	38
1. Objetivo.....	38
2. Desenho experimental.....	38
2.1. Desenvolvimento do método de extração de Cu, Cd e Pb em amostras de mel.....	38
2.2. Validação do método espectrofotométrico de absorção atômica por chama para detecção e quantificação de metais pesados (chumbo, cádmio e cobre) em mel nacional	38
2.2.1. Material e métodos	39
2.2.1.1. Reagentes	39
2.2.1.2. Equipamentos.....	39
2.2.2. Procedimento Experimental	39
2.2.2.1. Preparação das amostra	39
2.2.2.2. Avaliação dos parâmetros de validação do método espectrofotométrico de absorção atômica por chama	39
2.2.2.2.1. Linearidade e gama de trabalho	39
2.2.2.2.2. Exatidão (Recuperação).....	39
2.2.2.2.3. Precisão (Repetibilidade)	40
2.2.2.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação.....	40
2.2.2.2.5. Especificidade	40
2.2.3. Análise estatística.....	40
2.3. Detecção e quantificação de cobre e cádmio em amostras de mel nacional por espectrometria de absorção atômica por chama	40
2.3.1. Material e métodos	40
2.3.1.1. Reagentes	40
2.3.1.2. Equipamentos.....	40
2.3.1.3. Amostras	41
2.3.2. Procedimento experimental.....	41
2.3.2.1. Preparação da amostra	41
2.3.2.2. Quantificação de cobre e cádmio em amostras de mel nacional	42
2.3.3. Análise estatística.....	42
3. Resultados e Discussão.....	43
3.1. Validação do método espectrofotométrico de absorção atômica por chama para detecção e quantificação de metais pesados (chumbo, cádmio e cobre) em amostras de mel.....	43
3.2. Detecção e quantificação de Cu e Cd em amostras de mel nacional.....	46
3.3. Comparação dos resultados entre as diferentes regiões de Portugal	48
Capítulo - III. Conclusões	52
Bibliografia.....	54
Anexos	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Número de produtores apícolas em modo de produção biológica em Portugal, no ano de 2010	9
Figura 2 - Número de colmeias em modo de produção biológica em Portugal, no ano de 2010	9
Figura 3 - Variação das emissões de cádmio e chumbo na União Europeia entre 1990 e 2008 (índice 1990 = 100)	12
Figura 4 - Emissões de chumbo pelos diversos sectores em Portugal, no ano de 2009.....	13
Figura 5 - Emissões de cádmio pelos diversos sectores em Portugal, no ano de 2009.....	14
Figura 6 - Processamento do mel e fontes de contaminação	15
Figura 7 - Localização geográfica das amostras de mel analisadas.....	41
Figura 8 - Consumos energéticos (kWh) pela indústria nos concelhos de proveniência das amostras de mel.....	42
Figura 9 - Representação gráfica da curva de calibração para cádmio (Linearidade $R^2=0,99$; Equação da reta: $y=0,16235x+0,0015$)	44
Figura 10 - Representação gráfica da curva de calibração para cobre (Linearidade $R^2=0,99$; Equação da reta: $y=0,03417x+0,0015$)	44
Figura 11 - Concentração média de Cu (ppm) em amostras de mel nacional de diferentes origens geográficas	47
Figura 12 - Concentração média de Cd (ppm) em amostras de mel nacional de diferentes origens geográficas	47
Figura 13 - Concentração média de Cd (ppm) nas 21 amostras analisadas	49
Figura 14 - Concentração média de Cu (ppm) nas 21 amostras analisadas	50

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do mel (g/100g)	2
Tabela 2 - Composição mineral e vitamínica do mel	3
Tabela 3 - Produção de mel em Portugal.....	7
Tabela 4 - Evolução do número de apicultores, apiários e colmeias em Portugal entre 2007 e 2010 ...	7
Tabela 5 - Concentração de metais pesados (Cu, Cd, Pb) em mel.....	16
Tabela 6 - Amostras de mel analisadas entre 2006 e 2010 pelo Plano Nacional de Controlo de Resíduos	18
Tabela 7 - Número de amostras de mel analisadas e não-conformes por subgrupo na União Europeia, entre 2006 e 2010, pelos Estados-Membros	19
Tabela 8 - Resultados da monitorização do subgrupo B3c na União Europeia entre 2006 e 2010.....	19
Tabela 9 - Consumo energético pela indústria (kWh) por concelho no ano de 2009	43
Tabela 10 - Resultados de recuperação para Cu, Cd e Pb	45
Tabela 11 - Resultados da validação do método analítico (espectrometria de absorção atómica por chama) para deteção e quantificação de Cu, Cd e Pb.....	45
Tabela 12 - Concentração de Cu e Cd em mel nacional de diferentes origens geográficas	46
Tabela 13 - Análise de variância com um fator de variação (<i>OneWay Anova</i>) para Cd.....	48
Tabela 14 - Análise de variância com um fator de variação (<i>OneWay Anova</i>) para Cu	49
Tabela 15 - Teste t de Student para valores de cobre em dois grupos de amostras (industrialização “maior” e industrialização “menor”)	50
Tabela 16 - Teste t de Student para valores de cádmio em dois grupos de amostras (industrialização “maior” e industrialização “menor”)	51

ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica (Ing. <i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>)
AAS-GF	Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (Ing. <i>Atomic Absorption Spectroscopy in graphite furnace</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
As	Arsénio
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
Co	Cobalto
Cr	Crómio
Cu	Cobre
DCP-AES	Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma de Corrente Direta (Ing. <i>Direct current plasma atomic emission spectroscopy</i>)
dl	Decilitro
DL₅₀	Dose letal 50%
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
DGSANCO	Direção-Geral da Saúde e da Proteção do Consumidor (Ing. <i>Directorate-General for Health and Consumers</i>)
DMT1	Transportador de metais divalentes 1 (Ing. <i>Divalent metal transporter 1</i>)
DOP	Denominação de Origem Protegida
EEA	Agência Europeia do Ambiente (Ing. <i>European Environment Agency</i>)
EFSA	Agência Europeia para a Segurança Alimentar (Ing. <i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EMA	Agência Europeia do Medicamento (Ing. <i>European Medicines Agency</i>)
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica por chama (Ing. <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
Fe	Ferro
g	Grama
Hg	Mercúrio
HMF	Hidroximetilfurfural
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICP-AES	Espectrometria de Absorção Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (Ing. <i>Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy</i>)
INE	Instituto Nacional de Estatística
K	Potássio
K	Kelvin
kg	Quilograma

Kwh	Kilowatt por hora
l	Litro
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
LMR	Limite máximo de resíduos
Máx	Máximo
mg	Miligramma
Mg	Magnésio
ml	Mililitro
Min	Mínimo
Mn	Manganésio
MPB	Modo de produção biológica
Na	Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
P	Fósforo
Pb	Chumbo
PNCR	Plano Nacional de Controlo de Resíduos
ppm	Partes por milhão
p.s.	Peso seco
PTWI	<i>Provisional Tolerable Weekly Intake</i>
S	Enxofre
Se	Selénio
t	Tonelada
µg	Micrograma
µm	Micrómetro
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn	Zinco

CAPITULO - I. INTRODUÇÃO

1. O mel

“O mel é uma substância doce, natural, produzida por abelhas a partir do néctar das plantas ou de secreções das suas porções vivas ou de excreções de insectos sugadores nas porções vivas das plantas, as quais são recolhidas pelas abelhas, transformadas pela combinação com substâncias específicas, depositadas, desidratadas, armazenadas e deixadas a maturar” (World Health Organization [WHO], 1981, p.1, tradução livre).

1.1. Composição

O mel é um dos produtos mais complexos produzidos na natureza. É produzido por abelhas do género *Apis* e a sua composição depende da origem floral das plantas e da composição química do seu néctar e secreções. As abelhas recolhem a matéria-prima no papo e transportam-na para a colmeia, onde é transformado e maturado. Neste processo o néctar sofre duas alterações importantes, a primeira de carácter físico e a segunda de carácter químico. A desidratação do néctar (com humidade inicial de 30 a 80%) resulta da passagem de papo em papo, e a água perdida é absorvida pelas abelhas. A evaporação desencadeada pela elevada temperatura no interior da colmeia é também responsável por esta alteração física, apresentando o produto final humidade de 20%. A segunda modificação, de carácter químico, resulta da incorporação de enzimas ao néctar capazes de transformar os açúcares compostos (sacarose) em açúcares simples (frutose e glucose) (Martinho, 1988). O produto final, o mel, apresenta uma composição variada, com elevado teor em hidratos de carbono (frutose, glucose, maltose, sacarose), e outras substâncias como proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas e minerais (Pohl, 2009). Os principais constituintes do mel encontram-se na Tabela 1. O Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro estabelece critérios de composição do mel. Em termos gerais, são estabelecidos os teores de açúcar (teor de frutose e glucose, e teor de sacarose), teor de água, teor de matérias insolúveis em água, condutividade elétrica, ácidos livres, índice diastásico e teor de hidroximetilfurfural.

Tabela 1 - Composição do mel (g/100g)

	Mel de néctar ¹		Mel de melada ²	
	Média	Min-Máx	Média	Min-Máx
Água	17,2	15 - 20	16,3	15 - 20
Monossacarídeos				
Frutose	38,2	30 - 45	31,8	28 - 40
Glucose	31,3	24 - 40	26,1	19 - 32
Dissacarídeos				
Sacarose	0,7	0,1 - 4,8	0,5	0,1 - 4,7
Outros	5,0	2 - 8	4,0	1 - 6
Trissacarídeos				
Melezitose	<0,1		4,0	0,3 - 22,0
Erlase	0,8	0,5 - 6	1,0	0,1 - 6
Outros	0,5	0,5 - 1	3,0	0,1 - 6
Olissacarídeos indeterminados	3,1		10,1	
Total de açúcares	79,7		80,5	
Minerais	0,2	0,1 - 0,5	0,9	0,6 - 2,0
Aminoácidos, proteínas	0,3	0,2 - 0,4	0,6	0,4 - 0,7
Ácidos	0,5	0,2 - 0,8	1,1	0,8 - 1,5
pH	3,9	3,5 - 4,5	5,2	4,5 - 6,5

Legenda: Min. – Mínimo; Máx. – Máximo.

Fonte: Adaptado de Bogdanov *et al.*, 2008

Hidratos de Carbono. O mel é uma complexa mistura de hidratos de carbono, na qual cerca de 65 a 75% dos sólidos solúveis totais são glucose e frutose. Os oligossacarídeos estão também presentes mas em quantidades menores (Buldini, Cavalli, Mevoli & Sharma, 2001), tendo sido identificados pelo menos 25 oligossacarídeos diferentes. No mel de néctar, os dissacarídeos sacarose, maltose, trealose e turanose representam os principais oligossacarídeos, enquanto no mel de melada a melezitose e a rafinose foram identificadas em maiores quantidades (Bogdanov, Jurendic, Sieber, & Gallmann, 2008).

Hidroximetilfurfural. O hidroximetilfurfural (HMF) resulta da decomposição da frutose do mel e está presente em pequenas quantidades no mel fresco. O HMF é, atualmente, um indicador de frescura e sobreaquecimento do mel, a sua concentração aumenta durante o armazenamento e com o aumento da temperatura. Este composto não é tóxico nem representa perigo para o consumidor (Duarte, 2000). A legislação nacional estabelece um

¹ Mel obtido a partir do néctar das plantas (Decreto-Lei nº 214/2003).

² Mel obtido principalmente a partir de excreções de insectos sugadores de plantas (*hemiptera*) que ficam sobre as partes vivas das plantas ou de secreções provenientes de partes vivas das plantas (Decreto-Lei nº 214/2003).

limite máximo de 40 mg/kg de HMF no mel em geral, com exceção do mel de uso industrial; para o mel de regiões tropicais e misturas desses méis é estabelecido um teor máximo de 80 mg/kg (Decreto-Lei nº 214/2003).

Proteínas. As proteínas representam 0,5% da composição total do mel, e são na sua maioria enzimas e aminoácidos. As principais enzimas presentes no mel são a diastase (amilase), a invertase (sacarase, α -glucosidase) e glucose oxidase (Bogdanov *et al.*, 2008). A invertase é considerada a mais importante enzima do mel, sendo responsável pela conversão da sacarose do néctar em frutose e glucose.

Minerais e Vitaminas. O conteúdo mineral do mel de néctar varia entre 0,1 e 0,5%, enquanto o mel de melada pode apresentar valores superiores a 1%. O potássio é o mineral mais abundante, representando cerca de 45 a 85% do conteúdo mineral total (Pohl, 2009). Outros minerais como cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganésio, fósforo e zinco podem também estar presentes (Tabela 2). As vitaminas presentes no mel incluem a niacina, riboflavina, ácido pantoténico, vitaminas do complexo B, vitamina C, D e E.

Tabela 2 - Composição mineral e vitamínica do mel

Minerais (mg/100g)		Vitaminas (mg/100g)	
Sódio	1,6 - 17	Filocinona (Vitamina K)	0,025
Cálcio	3 - 31	Tiamina (Vitamina B)	0,00 - 0,01
Potássio	40 - 3500	Riboflavina (Vitamina B2)	0,01 - 0,02
Magnésio	0,7 - 13	Piridoxina (Vitamina B6)	0,01 - 0,32
Fósforo	2 - 15	Niacina	0,10 - 0,20
Zinco	0,05 - 2	Ácido Pantoténico	0,02 - 0,11
Cobre	0,02 - 0,6	Ácido Ascórbico (Vitamina C)	2,2 - 2,5
Ferro	0,003 - 4		
Manganésio	0,002 - 2		
Crómio	0,01 - 0,3		
Selénio	0,002 - 0,01		

Fonte: Adaptado de Bogdanov *et al.*, 2008

Contaminantes. Os contaminantes presentes no mel podem ser de origem microbiológica, química, física ou de plantas tóxicas. Os contaminantes microbiológicos mais importantes são fungos do género *Aspergillus*, leveduras do género *Saccharomyces* e microorganismos de contaminação fecal (*Enterococos*, *Escherichia coli*, *Salmonelas* e *Clostridium perfringens*). O mel pode ainda conter esporos de *Clostridium botulinum*, pelo que o seu consumo está contraindicado em crianças com menos de um ano de idade.

A contaminação do mel por pesticidas e antibióticos tem origem antropogénica, e vem assumindo um papel muito relevante no controlo da qualidade deste alimento. Os acaricidas são pesticidas e estão autorizados em Portugal para o controlo de pragas em mel. Os acaricidas autorizados são: amitraz, tau-fluvalinato, cumafos, flumetrina e timol. Estes fármacos são aplicados no combate do ectoparasita *Varroa destructor* e devem encontrar-se no mel abaixo dos limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos no Regulamento (CE) nº 37/2010 de 22 de Dezembro de 2009. Para o tau-fluvalinato e o timol não são estabelecidos LMR máximos em mel. Almeida (2010) analisou 23 amostras de mel Português e detectou a presença de cumafos (em 1 amostra) e de metiocarbe sulfóxido (em 3 amostras). A aplicação de antibióticos para tratamento de doenças apícolas bacterianas, como a Loque Americana (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) e a Loque Europeia (*Melissococcus pluton*) levam à contaminação deste produto alimentar. A aplicação de antibióticos na produção de mel não é permitida nos países da União Europeia e o Regulamento (CE) nº 37/2010 não estabelece LMR para antibióticos em mel. No entanto diversos estudos demonstram a presença de resíduos de antibióticos em mel de diferentes origens. Os autores Saridaki-Papakonstadinou, Andredakis, Burriel e Tsachev (2006) analisaram 251 amostras de mel grego e detetaram resíduos de antibióticos em 73 amostras. Os antibióticos detetados foram oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, sendo que o mais detetado foi a oxitetraciclina (em 34 das amostras analisadas). Em Portugal, Dias, Peres, Correia e Vilas-Boas (2008), analisaram 397 amostras de mel nacional e 25,9% das amostras foram suspeitas para a presença de resíduos de sulfonamidas e 2,3% para tetraciclinas. Das 103 amostras suspeitas para a presença de sulfonamidas foi confirmada a presença de sulfatiazol em 32%. Ainda em Portugal, Belas (2012) analisou 42 amostras de mel nacional e 9,7% das amostras foram suspeitas para a presença de resíduos de sulfatiazol (nas amostras da região Centro e Alentejo).

No que respeita à contaminação de mel por plantas tóxicas esta deve-se à produção de néctar rico em substâncias nocivas. Em Portugal, a espécie *Rhododendron ponticum* origina méis tóxicos (Duarte, 2000), e pode ser encontrada na Serra de Monchique e na Serra do Caramulo.

1.2. Propriedades nutricionais e terapêuticas do mel

O mel é um alimento largamente utilizado como substituto do açúcar devido ao seu elevado conteúdo em hidratos de carbono. No entanto, são inúmeras as suas propriedades nutricionais, já que apresenta na sua composição vitaminas, minerais, enzimas,

antioxidantes, proteínas e aminoácidos. Este produto alimentar apresenta inúmeras propriedades terapêuticas e a sua utilização na medicina moderna é crescente. Diversos estudos demonstram as suas propriedades antimicrobianas, antivirais, antiparasitárias e antioxidantes. O mel é bactericida e bacteriostático, e apresenta atividade antimicrobiana sobretudo contra bactérias gram-positivas. Alguns dos microrganismos sensíveis ao mel são *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae* e *Staphylococcus aureus* (Bogdanov *et al.*, 2008). A produção de peróxido de hidrogénio pela enzima glucose oxidase do mel confere propriedades antimicrobianas a este alimento. Irish, Blair e Carter (2011) analisaram 477 amostras de mel australiano e demonstraram que 57% das amostras apresentavam atividade antimicrobiana. A utilização de mel no tratamento de feridas e na regeneração de tecidos lesionados é benéfica, aumentando a taxa de cura, já que o mel estimula o crescimento de tecido de granulação, reduz o edema, reduz as aderências pós-operatórias, promove a epitelização da ferida e reduz a dor (Al-Waili, Salom & Al-Ghamdi, 2011). A atividade antifúngica do mel foi demonstrada em dermatófitos e em leveduras. Por outro lado, outros estudos têm também alertado para a sua ação antiviral, e para uma ação antiparasitária contra algumas espécies de *Leishmania* e *Echinococcus* (Bogdanov *et al.*, 2008).

O mel possui características antioxidantes, modulando a produção de radicais livres e desempenhando um papel quelante na sua presença. A atividade antioxidante deste alimento assemelha-se à de frutos e vegetais, e encontra-se relacionada com o teor em polifenóis e com a capacidade de resgate de radicais livres. Os polifenóis são substâncias naturais, geralmente encontradas nas plantas, e com propriedades antioxidantes naturais. Os flavonóides são polifenóis e fazem parte da composição do mel. Os méis mais escuros, como o mel de urze, apresentam teor mais elevado em antioxidantes (Serra, 2011).

1.3. Enquadramento legislativo referente ao mel

O direito nacional contempla as seguintes peças legislativas referentes ao mel:

- **Decreto-Lei nº 214/2003, de 18 de Setembro de 2003, publicado em Diário da República I série, nº 216**, transpõe para a ordem jurídica nacional a Diretiva nº 2001/110/CE, do Conselho, de 20 de Dezembro, relativa ao mel, e que define as condições de produção e comercialização do mel.
- **Decreto-Lei nº 203/2005, de 25 de Novembro de 2005, publicado em Diário da República I série-A, nº 227**, estabelece o regime jurídico da atividade apícola e as

normas sanitárias para defesa contra as doenças das abelhas, revogando o Decreto-Lei nº 37/2000, de 14 de Março, e o Decreto-Lei nº 74/2000, de 6 de Março.

- **Decreto-Lei nº 1/2007, de 2 de Janeiro de 2007, publicado em Diário da República I série, nº 1**, estabelece as condições de funcionamento dos locais de extração e processamento do mel, complementares aos Regulamentos nº 853/2004 e nº 852/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, e institui o regime e condições de registo e aprovação.
- **Portaria nº 699/2008, de 29 de Julho de 2008, publicado em Diário da República I série, nº 145**, regulamenta as derrogações previstas no Regulamento (CE) nº 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, e no Regulamento (CE) nº 2073/2005, da Comissão de 15 de Novembro, estabelecendo regras para o fornecimento direto, pelo produtor, de pequenas quantidades de produtos primários ao consumidor final.

O mel é um produto de origem animal e resulta de um modo de produção primária. Assim, encontra-se regulamentado pelos seguintes Regulamentos Europeus:

- **Regulamento (CE) nº 178/2002, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002**, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.
- **Regulamento (CE) nº 852/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004**, relativo à higiene dos géneros alimentícios.
- **Regulamento (CE) nº 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004**, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- **Regulamento (CE) nº 854/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004**, que estabelece regras específicas de organização dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano.
- **Regulamento (CE) nº 834/2007, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Junho de 2008**, relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos e que revoga o Regulamento (CE) nº 2092/91.

1.4. Sector apícola nacional

A apicultura em Portugal assume cada vez mais um papel determinante na atividade agrícola do país. É uma atividade sustentável, e que envolve não só a criação de abelhas, mas também a produção de mel, própolis, geleia real, pólen e cera para fins comerciais. O papel polinizador das abelhas nos ecossistemas é determinante em diversas culturas agrícolas, e de elevada importância no equilíbrio dos ecossistemas.

A produção de mel em Portugal cresceu entre 2006 e 2010 (Tabela 3). De acordo com o Decreto-Lei nº 203/2005 de 25 de Novembro a atividade apícola carece de registo, sendo obrigatória a declaração de existências semestralmente. Neste processo a Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária é a entidade coordenadora.

Tabela 3 - Produção de mel em Portugal

Ano de Produção	Produção de mel (t)/anual
2010	7426
2009	6919
2008	6654
2007	6907
2006	5978

Legenda: t - toneladas

Fonte: Instituto Nacional de Estatística [INE], 2011

Em Portugal, existem atualmente mais de 17.000 apicultores e mais de 500.000 colmeias (Tabela 4). Na região centro do país estão registados 6684 apicultores, 4854 na região norte, 2306 na região de Lisboa e Vale do Tejo, 1666 no Alentejo, 893 no Algarve, 553 na Madeira e 335 no arquipélago dos Açores (Gabinete de Planeamento e Políticas [GPP], 2010a).

Tabela 4 - Evolução do número de apicultores, apiários e colmeias em Portugal entre 2007 e 2010

	2007	2010	Variação %
Nº de apicultores	15 267	17 291	+13,3
Nº de apiários	32 685	38 203	+17,0
Nº de colmeias	555 049	562 557	+1,4

Fonte: GPP, 2010a

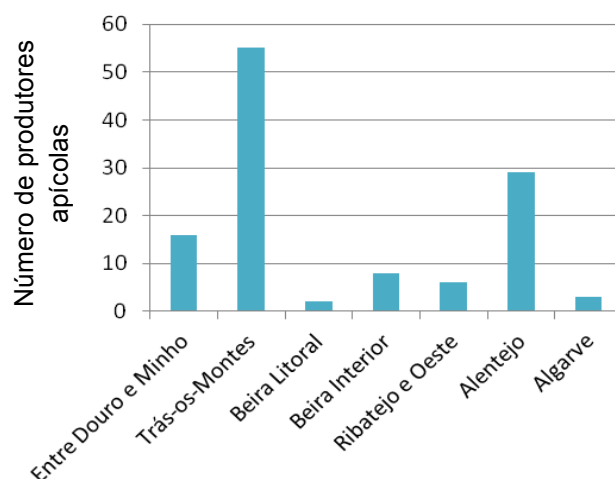
A elevada exigência dos consumidores tem feito com que a produção de mel em Portugal seja alvo de melhoramento, e que surjam no mercado produtos diferenciados. Desta forma, a nível nacional existem nove tipos de mel com Denominação de Origem Protegida: Mel do Alentejo, Mel do Barroso, Mel da Serra da Lousã, Mel da Serra de Monchique, Mel do Parque de Montesinho, Mel da Terra Quente, Mel do Ribatejo Norte, Mel das Terras Altas do Minho e Mel dos Açores. A certificação DOP é regulamentada pelo Regulamento (CE) nº 501/2006, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Março, no qual se estabelece que este tipo de certificação é limitado aos géneros alimentícios nos quais se pode estabelecer uma relação direta entre as suas características e a região geográfica de origem. Pretende-se valorizar e proteger as regiões de produção e os produtos nelas produzidos. O mel com DOP deve ser originário da região de denominação, ou seja, a sua produção, transformação e elaboração ocorre nessa área geográfica delimitada. Por outro lado, a produção biológica de mel é cada vez mais valorizada graças à procura crescente de produtos “naturais” e “biológicos”.

A produção biológica deve obedecer às regras que constam no Regulamento (CE) nº 834/2007, do Parlamento e do Conselho, de 28 de Junho, e que de forma geral, estabelece a utilização de recursos renováveis, a minimização da utilização de recursos não-renováveis, a reciclagem de subprodutos vegetais e animais, a preservação da biodiversidade e dos ecossistemas. Os produtos apícolas só são considerados resultantes de modo de produção biológica (MPB) após um ano de aplicação das medidas referidas anteriormente, as abelhas devem pertencer a raças autóctones (raças europeias de *Apis mellifera*) e serem resultantes de MPB. Por outro lado, deve garantir-se que os apiários se encontram longe de fontes de contaminação (autoestradas, zonas industriais, etc) e a aplicação de medicamentos veterinários só está autorizada quando está em causa a sobrevivência das colónias. O uso de produtos químicos para fumigação é proibida e no controlo da varroose apenas está autorizada a aplicação de óleos essenciais (cânfora, mentol, timol e eucaliptol) e ácidos orgânicos (ácido acético, fórmico, láctico e oxálico). A produção de mel em MPB é ainda reduzida na apicultura nacional. No entanto, o número de produtores em MPB é crescente, e no ano de 2010 registavam-se 119 produtores (Figura 1), e 15.927 colmeias (Figura 2).

O consumo de mel *per capita* em Portugal é de 0,7 kg/ano (INE, 2011). Os consumidores Portugueses consideram o mel benéfico para a saúde, preferem adquiri-lo diretamente ao produtor (na região de origem), com exceção do consumidor da região de Lisboa, e valorizam sobretudo o paladar e a textura (GPP, 2010a). Ribeiro *et al.* (2009) efetuaram a análise do consumidor de mel, no distrito de Bragança, demonstrando que o consumidor desta região adquire o produto diretamente ao produtor, consome mel semanalmente e

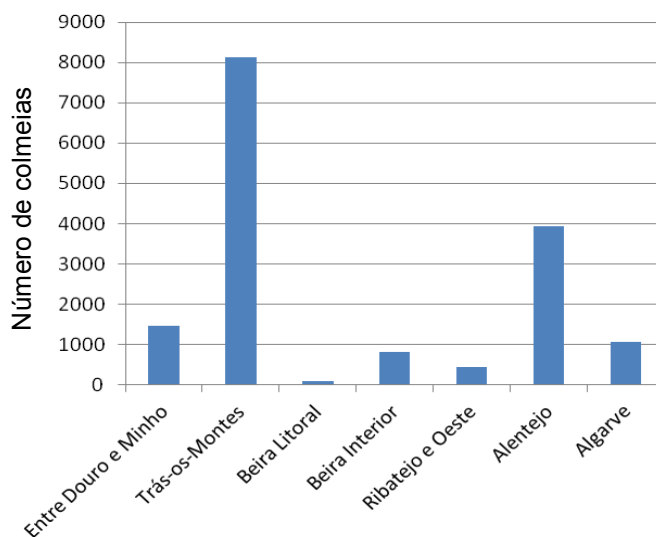
preferencialmente no Outono/Inverno. A amostra era constituída por 172 pessoas, todas do distrito de Bragança.

Figura 1 - Número de produtores apícolas em modo de produção biológica em Portugal, no ano de 2010



Fonte: GPP, 2010b

Figura 2 - Número de colmeias em modo de produção biológica em Portugal, no ano de 2010



Fonte: GPP, 2010b

2. A contaminação de mel por metais pesados

O mel apresenta na sua composição minerais importantes ao organismo humano. Estes minerais, parte constituinte do solo, são absorvidos e transportados para o néctar. A composição do mel depende, portanto, das características do solo e da variedade botânica das plantas percorridas pelas abelhas. As abelhas utilizam todos os compartimentos ambientais, como o solo, as plantas, o ar e também a água. A poluição ambiental destes compartimentos leva a consequente contaminação das plantas, do seu néctar e das abelhas. No processo de polinização as abelhas percorrem uma vasta área que, em média, pode atingir os 7 km. O mel produzido por uma colmeia pode assim resultar de inúmeras interações, e logo ser o reflexo da área percorrida (Buldini *et al.*, 2001; Bogdanov, 2006; Garcia *et al.*, 2006). Assim, diversos autores como Conti e Botrè (2001) e Perugini *et al.* (2010) apontam as abelhas e os seus produtos como bioindicadores da poluição ambiental. A crescente industrialização, urbanização e desenvolvimento das redes rodoviárias (com consequente aumento da utilização dos combustíveis fósseis) têm exercido um impacto negativo na biosfera, destruindo o equilíbrio ecológico e colocando em perigo os sistemas biológicos que a constituem. A poluição atmosférica contribui de forma significativa para o decréscimo da produtividade agrícola e representa uma ameaça à biodiversidade. As indústrias emitem diversos poluentes, como partículas, líquidos e gases para a atmosfera. Estes compostos sofrem diferentes transformações (físicas, químicas e fotoquímicas), dispersam-se por longas distâncias, dependendo o seu destino final de condições topográficas e meteorológicas (Agrawal & Agrawal, 1999). As propriedades químicas dos metais e as fontes de emissão são fatores importantes que determinam o seu transporte. Para metalóides como o As, Hg e Se o transporte na fase gasosa assume maior relevância, enquanto metais menos voláteis como o Pb, Mn e Zn são transportados na fase sólida (sob a forma de partículas) (Adriano, 1992). Os poluentes, e em particular os metais pesados, podem depositar-se diretamente nas abelhas, ou contaminá-las indiretamente através do néctar, do pólen, da melada, ou da água ingerida (Porrini *et al.*, 2003; Perugini *et al.*, 2010). Assim, de forma a evitar a sua contaminação, a localização dos apiários deve respeitar alguns critérios. A sua implantação deve evitar zonas urbanas, autoestradas, parques industriais, aterros e incineração de lixo (Neves, 2006). O Decreto-Lei nº 203/2005 de 25 de Novembro estabelece ainda que a localização e implantação dos apiários não deverá ser inferior a 50 metros da via pública nem inferior a 100 metros de qualquer edificação em utilização.

2.1. A poluição ambiental: uma fonte de contaminação

A poluição atmosférica por metais pesados é considerada uma fonte importante de entrada destes elementos nos ciclos biológicos, e consequentemente na cadeia alimentar. As emissões de metais pesados para a atmosfera devem-se a causas naturais e a causas antropogénicas. Diversos fenómenos naturais parecem estar envolvidos, a erosão rochosa e a atividade vulcânica estão associados à libertação de cádmio e de cobre para a atmosfera, os quais são depois depositados nos solos e água através dos ventos e precipitação. Os incêndios florestais por outro lado originam elevadas quantidades de poeiras ricas em metais, e que se depositam de igual forma nos solos, água e plantas.

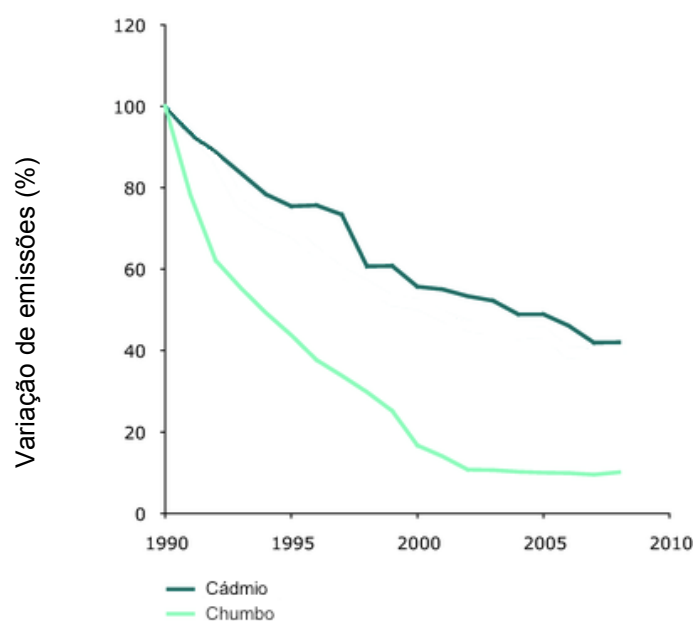
Atualmente, podem também apontar-se diversas causas antropogénicas. A inadequada aplicação de fertilizantes na agricultura é uma causa importante de entrada de metais nos solos. A aplicação de fertilizantes de fosfato é uma fonte significativa de entrada de cádmio nos solos (He, Yang, & Stoffella, 2005; European Food Safety Authority [EFSA], 2009), representando 41,3%, seguindo-se a combustão de combustíveis fósseis (22%), a produção de ferro e aço (16,7%), fontes naturais (8,0%), metais não ferrosos (6,3%), produção de cimento (2,5%), produtos de cádmio (pigmentos de tintas, plásticos) (2,5%) e incineração de resíduos (1,0%) (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica [ASAE], 2009). A utilização de fungicidas ricos em cobre, como o sulfato de cobre, em culturas como macieira, videira, batateira, pessegueiro pode ser responsável pela contaminação por cobre dos solos, e de colmeias vizinhas a estas culturas. A introdução de cobre nos solos e consequente contaminação da cadeia alimentar deve-se não só a fertilizantes, fungicidas e algicidas contendo cobre, como também à incineração de resíduos municipais, a fundições e à atividade mineira (WHO, 1998). O chumbo, por sua vez, é emitido pelas industriais metalúrgicas, pela produção de calor, energia elétrica, combustão de combustíveis fósseis e atividade mineira (EFSA, 2010).

A entrada de metais pesados (cobre, cádmio, chumbo) nos solos agrícolas através da aplicação de lamas encontra-se legislada, e são definidas as concentrações máximas permitidas. Segundo o Decreto-Lei nº 118/2006 de 21 de Junho, o direito nacional define os valores limite de concentração de metais pesados nas lamas destinadas à agricultura, a concentração de metais pesados nos solos de destino e os valores limite para as quantidades anuais de metais que podem ser introduzidos nos solos cultivados.

As emissões industriais de cádmio e chumbo são importantes fontes antropogénicas nas sociedades modernas, e apontadas como causa da contaminação ambiental por estes metais. A Diretiva nº 2008/50/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Maio,

define as regras relativas à qualidade do ar ambiente na Europa. Por outro lado, a Diretiva nº 2004/107/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Dezembro de 2004, estabelece valores alvo para o arsénio, cádmio, mercúrio, níquel e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar ambiente. No quadro nacional, o Decreto-Lei nº 102/2010 de 23 de Setembro estabelece o regime de gestão e avaliação da qualidade do ar ambiente, transpondo para a ordem jurídica interna a Diretiva nº 2008/50/CE e a Diretiva nº 2004/107/CE. Na União Europeia, as emissões de cádmio e chumbo têm decrescido (Figura 3). Entre 1990 e 2008, as emissões de cádmio decresceram 58% enquanto as de chumbo sofreram uma redução de 90% (European Environment Agency [EEA], 2011b).

**Figura 3 - Variação das emissões de cádmio e chumbo na União Europeia entre 1990 e 2008
(índice 1990 = 100)**

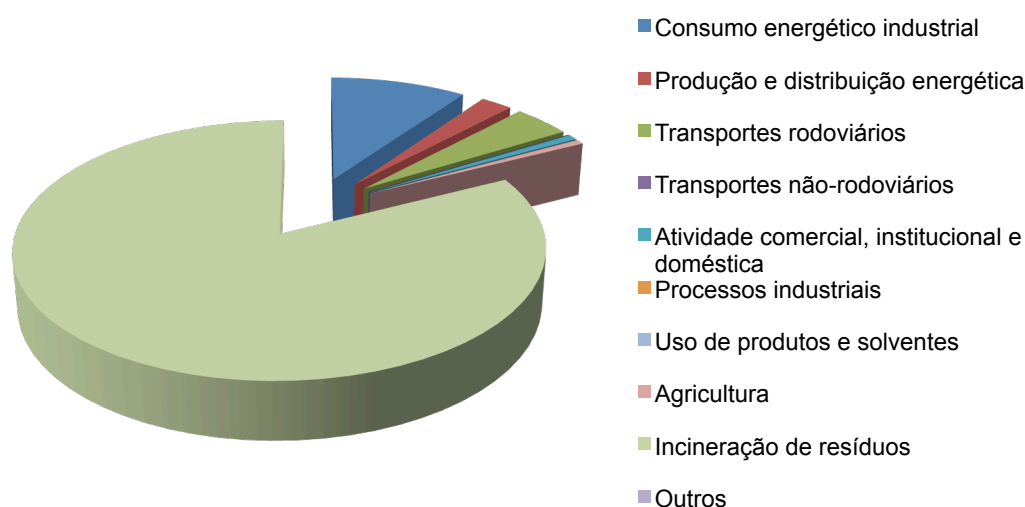


Fonte: EEA, 2011b

A Diretiva nº 98/70/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 13 de Outubro, transposta para o direito nacional pelo Decreto-Lei nº 186/99 de 31 de Maio e pelo Decreto-Lei nº 104/2000 de 3 de Junho, veio estabelecer a proibição da comercialização da gasolina com chumbo e estabelecer disposições relativas à qualidade da gasolina e gasóleo. O Decreto-Lei nº 89/2008, de 30 de Maio, estabelece ainda especificações quanto à gasolina e gasóleo, estabelecendo um teor máximo de 0,005 g/l de chumbo na gasolina. Em Portugal, as emissões de chumbo provenientes do sector dos transportes rodoviários sofrem assim, desde 1999, uma redução de 98%. Em 1999 foram emitidas pelo sector dos transportes

267,733 t, enquanto que em 2009 as emissões de Pb medidas rondam as 6,478 t. No quadro nacional, as emissões de chumbo pelo sector rodoviário representaram 3,6% das emissões totais no ano de 2008, e 3,9% em 2009. No entanto este sector representa, em 2009, 8% das emissões totais deste metal pesado na União Europeia (EEA, 2011a). Em Portugal, neste mesmo ano, foram emitidas 164,385 t de Pb e os sectores com maiores taxas de emissões são a incineração de resíduos (82,4%) e o consumo de energia pela indústria (9,8%) (Figura 4).

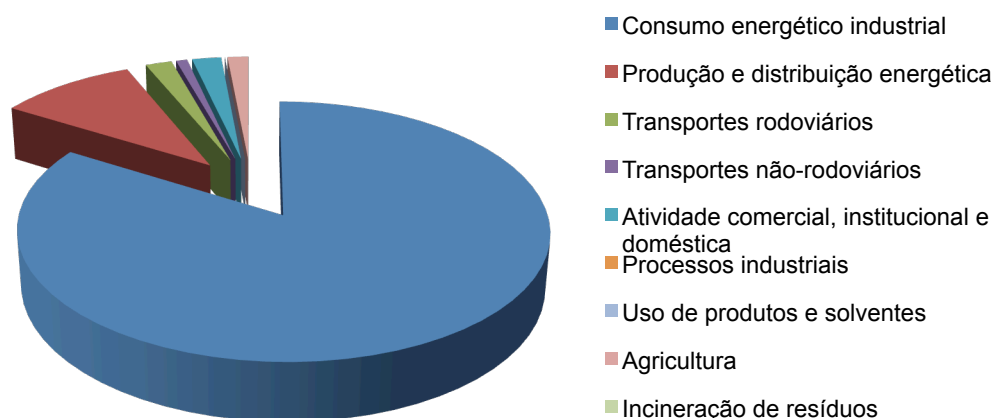
Figura 4 - Emissões de chumbo pelos diversos sectores em Portugal, no ano de 2009



Fonte: EEA, 2011a

No ano de 2008, Portugal encontrava-se entre os principais países emissores de cádmio na União Europeia, responsável por 4% das emissões totais. De acordo com a EEA foram emitidas em Portugal 5,004 t de cádmio neste mesmo ano. No entanto, diversas medidas têm contribuído para a diminuição das emissões de cádmio. A Diretiva nº 2008/1/CE de 15 de Janeiro, do Parlamento Europeu e do Conselho, fixou medidas de melhoramento na gestão de resíduos, na indústria química, na produção e transformação de metais, e na indústria do sector da energia. Em 2009 as emissões de Cd em Portugal decresceram, registando-se 3,390 t emitidas, sendo o consumo de energia pela indústria responsável pela emissão de 83,9% do total emitido (Figura 5) (EEA, 2011a). De acordo com a Agência Portuguesa do Ambiente (2011), em 2009, registaram-se emissões de cádmio apenas em três concelhos: Coimbra com 0,001 t/km², Funchal com 0,001 t/km² e Vila Franca de Xira com 0,006 t/km². Nesse mesmo ano detetaram-se emissões de chumbo em 225 concelhos, destacando-se os concelhos de Amadora com 0,109 t/km², Lisboa com 0,103 t/km² e Porto com 0,094 t/km².

Figura 5 - Emissões de cádmio pelos diversos sectores em Portugal, no ano de 2009

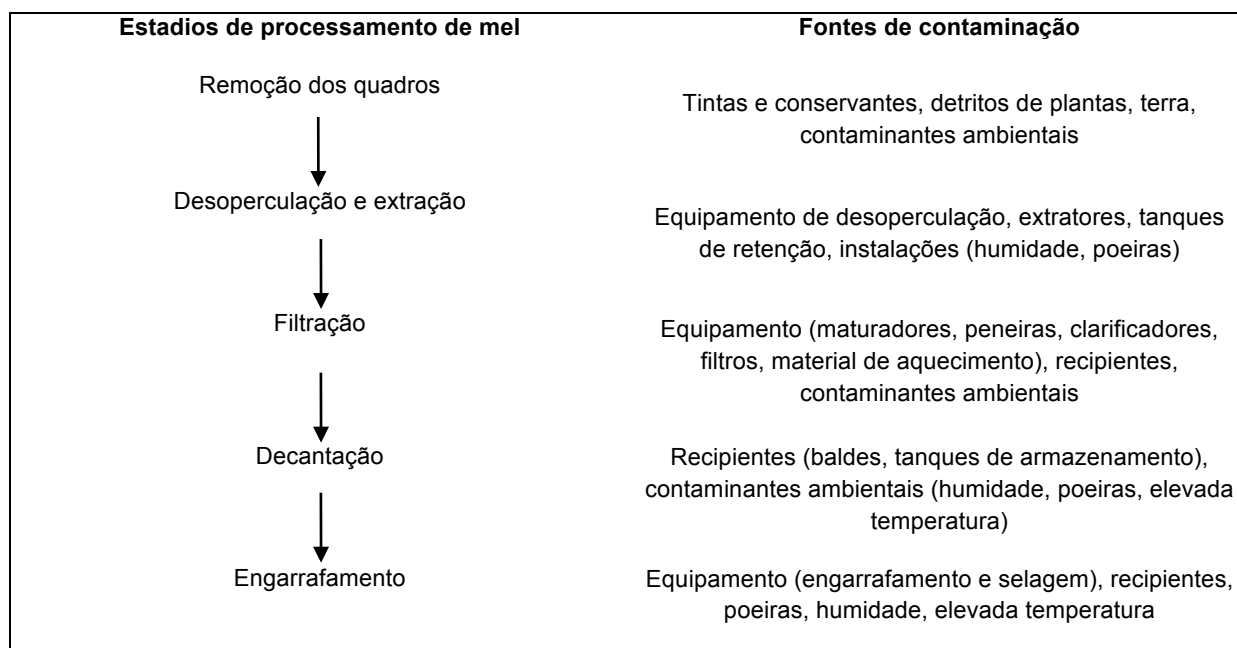


Fonte: EEA, 2011a

2.2. Contaminação de mel por metais pesados: outros fatores

A incorreta prática apícola pode introduzir contaminantes de natureza química ou de natureza biológica, constituindo assim um importante fator de risco. A implantação das colmeias deve depender de boas práticas apícolas, já que a incorreta implantação das mesmas pode determinar a sua contaminação por estes agentes. Desta forma, a contaminação das colmeias por incorreta prática apícola é mais importante que a sua contaminação por fontes ambientais (Neves, 2006), já que o apicultor é quem define a localização dos seus apiários e logo a área de produção do mel. A contaminação do mel por metais pesados pode dever-se às tintas e vernizes para conservação das colmeias, à incorreta higienização dos veículos de transporte, das instalações de extração e acondicionamento e à utilização de utensílios de materiais inadequados. A Figura 6 resume as diferentes fases de processamento do mel e as possíveis fontes de contaminação associadas. Nos processos de cresta, transporte das alças, extração e acondicionamento do mel devem aplicar-se boas práticas de higiene, de acordo com o Regulamento (CE) nº 852/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril. Alguns contaminantes metálicos podem ainda ser introduzidos através da alimentação artificial das abelhas. As soluções de suplementação nutricional podem apresentar elevadas concentrações de Cd, Co, Fe, K, Mg, Mn, Pb e Na, resultantes de contaminação durante o seu processamento (Pohl, 2009).

Figura 6 - Processamento do mel e fontes de contaminação



Fonte: adaptado de Pohl (2009)

2.3. Enquadramento legislativo e estudos de pesquisa referentes à presença de metais pesados em mel

Os teores máximos de contaminantes nos géneros alimentícios estão estabelecidos no Regulamento (CE) nº 1881/2006, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de Dezembro, incluindo os teores máximos de Cd e Pb. Os níveis permitidos de Cd variam entre 0,05 mg/kg (carne, com exceção das miudezas, de bovino, ovino, suíno e aves de capoeira; parte comestível de peixe; produtos hortícolas e frutos, com exceção de produtos hortícolas de folhas, plantas aromáticas frescas, cogumelos, produtos hortícolas de caule, pinhões, raízes e batatas) e 1,0 mg/kg (rim de bovino, ovino, suíno, aves de capoeira e equídeo; moluscos bivalves; cefalópodes, sem vísceras), enquanto os níveis de chumbo variam entre 0,02 mg/kg (leite cru, leite tratado termicamente e leite para o fabrico de produtos lácteos; fórmulas para lactentes e fórmulas de transição) e 1,5 mg/kg (moluscos bivalves). A legislação comunitária e a legislação nacional não estabelecem limites máximos de Cd e Pb no mel, no entanto, diversos estudos têm demonstrado a presença destes metais em mel de diferentes origens geográficas (Tabela 5). O *Codex Alimentarius* (1981), em *Standard for honey*, revisto em 2001, refere apenas que o mel não deve apresentar metais pesados em concentrações que representem perigo para a saúde pública.

Tabela 5 - Concentração de metais pesados (Cu, Cd, Pb) em mel

Metal Pesado	Origem	Concentração	Método Analítico	Referência
Cu	Alemanha	0,04 - 1,0 mg/kg	ICP-AES	Raeymaekers, 2006
	Chile	0,08 ± 0,30 mg/kg	ICP-AES	Fredes & Montenegro, 2006
	Espanha (Galiza)	0,8 mg/kg	ETAAS	Garcia <i>et al.</i> , 2006
	Espanha (Tenerife)	1,28 mg/kg	ICP-AES	Frías <i>et al.</i> , 2008
	Paquistão	1,753 ± 0,10 mg/kg	AAS	Saif-ur-Rehman <i>et al.</i> , 2008
	Reino Unido	0,505 ± 0,790 mg/kg	AAS-GF	Jones, 1987
	República Checa	0,06 - 1,55 mg/kg	ETAAS	Čelechovská <i>et al.</i> , 2001
	Rep. da Macedónia	0,696 mg/kg	ETAAS	Stankovska <i>et al.</i> , 2008
	Turquia	0,01 ± 0,02 mg/kg	FAAS	Erbilir <i>et al.</i> , 2005
	Venezuela	0,76 ± 0,43 mg/kg	FAAS	Ferrer <i>et al.</i> , 2004
Cd	Alemanha	0,001 - 0,009 mg/kg	AAS-GF	Raeymaekers, 2006
	Chile	0,01 ± 0,01 mg/kg	ICP-AES	Fredes & Montenegro, 2006
	Espanha (Galiza)	0,0025 mg/kg	ETAAS	Garcia <i>et al.</i> , 2006
	Espanha (Tenerife)	0,00438 mg/kg	AAS-GF	Frías <i>et al.</i> , 2008
	Itália	<0,002 - 0,063 mg/kg	AAS-GF	Conti & Botrè, 2001
	Polónia	0,015 mg/kg	AAS	Przybylowski & Wilczynska, 2001
	Reino Unido	0,028 ± 0,058 mg/kg	AAS-GF	Jones, 1987
	República Checa	0,0005 - 0,077 mg/kg	ETAAS	Čelechovská <i>et al.</i> , 2001
	República da Macedónia	0,004 mg/kg	ETAAS	Stankovska <i>et al.</i> , 2008
	Turquia	0,32 ± 0,01 mg/kg	FAAS	Erbilir <i>et al.</i> , 2005
Pb	Alemanha	<0,005 - 0,03 mg/kg	AAS-GF	Raeymaekers, 2006
	Chile	0,02 ± 0,03 mg/kg	ICP-AES	Fredes & Montenegro, 2006
	Espanha (Galiza)	0,015 mg/kg	ETAAS	Garcia <i>et al.</i> , 2006
	Espanha (Tenerife)	0,037 mg/kg	AAS-GF	Frías <i>et al.</i> , 2008
	Itália	0,003 - 0,045 mg/kg	AAS-GF	Conti & Botrè, 2001
	Polónia	0,048 mg/kg	AAS	Przybylowski & Wilczynska, 2001
	Reino Unido	0,051 ± 0,051 mg/kg	AAS-GF	Jones, 1987
	República Checa	0,02 - 1,0 mg/kg	ETAAS	Čelechovská <i>et al.</i> , 2001

Legenda: AAS – Espectrometria de absorção atômica; ETAAS – Espectrometria de absorção atômica eletrotermal; FAAS – Espectrometria de absorção atômica por chama; AAS-GF – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite; ICP-AES – Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente.

Alguns dos estudos apresentados na Tabela 5 encontraram uma evidente contaminação ambiental nas amostras de mel analisadas. Fredes e Montenegro (2006) analisaram 47 amostras de mel chileno e detetaram a presença de Cd em 14,9% das amostras e Pb em 34%. Neste estudo as amostras com níveis mais elevados de Cd e Pb correspondiam às amostras recolhidas de colmeias localizadas perto de autoestradas. Por outro lado, Stankovska *et al.* (2008) encontraram concentrações maiores de Cu em zonas de atividade mineira, e elevadas concentrações de Cd em zonas ricas em fundições de zinco e chumbo. Neste estudo foram analisadas 123 amostras de mel. Noutro estudo, no qual se analisaram 30 amostras de mel italiano, Conti e Botrè (2001) detetaram também que as amostras de zonas mais industrializadas apresentavam concentrações mais elevadas de Cd e Pb.

3. Monitorização de resíduos em mel em Portugal e na União Europeia

Na União Europeia todos os estados membros devem apresentar planos de monitorização para certas substâncias e resíduos nos produtos de origem animal e nos animais vivos, de acordo com a Diretiva do Conselho nº 96/23/CE, de 29 de Abril. Todos os países devem reportar anualmente os seus resultados, e um relatório anual é publicado pela DG SANCO. Em Portugal, a pesquisa de resíduos é efetuada de acordo com o Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR). O PNCR concretiza os objetivos do Decreto-Lei nº 148/99 de 4 de Maio, que aplica ao direito nacional a Diretiva nº 96/23/CE e a Decisão da Comissão nº 97/747/CE de 27 de Outubro, e os objetivos do Decreto-Lei nº 185/05 de 4 de Novembro, que transpõem para o direito nacional a Diretiva nº 96/22/CE do Conselho, de 29 de Abril, com as alterações introduzidas pela Diretiva nº 2003/74/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro. O Plano Nacional de Controlo de Resíduos permite assim o controlo dos resíduos de medicamentos veterinários, contaminantes ambientais, uso de substâncias proibidas e uso abusivo de substâncias autorizadas (Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV], 2010). A Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária é a entidade responsável pela implementação e coordenação das medidas do PNCR.

Os limites máximos de resíduos para medicamentos veterinários e pesticidas estão estabelecidos no Regulamento (CE) nº 37/2010 de 22 de Dezembro e os teores máximos para contaminantes no Regulamento (CE) nº 1831/2003 de 18 de Dezembro e Regulamento (CE) nº 396/2005 de 23 de Fevereiro. No mel são monitorizados os subgrupos: A6 – substâncias inscritas no anexo IV do Regulamento nº 2377/90; B1 – substâncias antibacterianas incluindo sulfamidas e quinolonas; B2c – piretróides; B3a – organoclorados

incluindo os PCB; B3b – compostos organofosforados; B3c – elementos químicos (metais pesados); B3d - micotoxinas.

A amostragem para monitorização de resíduos em mel é realizada nas explorações pela ASAE e nos postos de inspeção fronteiriça (PIF). O número de amostras de mel colhidas anualmente é calculado de acordo com a produção anual de mel, no mínimo 10 amostras por cada 300 t até as primeiras 3000 t, mais uma amostra por cada 300 t adicionais, de acordo com a Decisão da Comissão nº 97/747/CE de 27 de Outubro. A mesma decisão da comissão define repartições obrigatórias: em 50% das amostras devem ser pesquisados os subgrupos B1 e B2c, 40% das amostras para pesquisa dos subgrupos B3a, B3b e B3c, e nos 10% restantes a pesquisa é efetuada de acordo com a experiência do estado-membro. Em Portugal, no ano de 2010 foram recolhidas 116 amostras de mel para controlo, e 15 foram analisadas para pesquisa de elementos químicos (cádmio e chumbo). Todas as amostras eram conformes, ou seja, em nenhuma amostra foi detetada a presença de cádmio ou chumbo. A Tabela 6 apresenta os resultados da monitorização de resíduos em mel pelo PNCR entre 2006 e 2010. Nos anos de 2008 e 2010 uma amostra era não conforme para o subgrupo B1.

Tabela 6 - Amostras de mel analisadas entre 2006 e 2010 pelo Plano Nacional de Controlo de Resíduos

Ano	Amostras colhidas por subgrupo						Amostras não conformes
	A6	B1	B2c	B3a	B3b	B3c	
2010	9	34	28	15	15	15	1
2009	10	32	32	20	0	20	0
2008	10	37	33	21	21	42	1
2007	6	7	18	5	3	15	0
2006	11	22	5	10	6	8	0

Legenda: A6 – substâncias inscritas no anexo IV do Regulamento (CE) nº 2377/90; B1 – substâncias antibacterianas incluindo sulfamidas e quinolonas; B2c – piretróides; B3a – organoclorados incluindo os PCB; B3b – compostos organofosforados; B3c – elementos químicos (metais pesados).

Na União Europeia, o número de amostras de mel analisadas e não-conformes pelos estados membros, entre 2006 e 2010, apresentam-se na Tabela 7. Neste período o subgrupo B1 (substâncias antibacterianas) apresentou maior número de amostras não

conformes. No subgrupo B3c (metais pesados), detetaram-se 5 amostras não conformes em 2006, 16 em 2007, e 4 em 2008, 2009 e 2010. Na Tabela 8 apresentam-se ainda os resultados da monitorização de metais pesados em mel indicando-se os países onde foram detetadas amostras não conformes e quais os metais encontrados. Não foi possível obter informação sobre os métodos analíticos utilizados. O chumbo foi o metal pesado mais detetado nas amostras não-conformes.

Tabela 7 - Número de amostras de mel analisadas e não-conformes por subgrupo na União Europeia, entre 2006 e 2010, pelos Estados-Membros

Ano	Amostras não conformes por subgrupo						Total de amostras analisadas
	A6	B1	B2c	B3a	B3b	B3c	
2010	0	69	1	0	1	4	4720
2009	0	23	0	1	0	4	4826
2008	0	28	1	2	1	4	5345
2007	1	19	1	0	0	16	5850
2006	2	28	2	0	0	5	5891

Legenda: A6 – substâncias inscritas no anexo IV do Regulamento (CE) nº 2377/90; B1 – substâncias antibacterianas incluindo sulfamidas e quinolonas; B2c – piretróides; B3a – organoclorados incluindo os PCB; B3b – compostos organofosforados; B3c – elementos químicos (metais pesados).

Tabela 8 - Resultados da monitorização do subgrupo B3c na União Europeia entre 2006 e 2010

Ano	País	Metal Pesado	Amostras analisadas	Amostras não-conformes
2010	Dinamarca	Cobre	11	3
	Irlanda	Chumbo	10	1
2009	França	Chumbo	50	4
2008	França	Chumbo	50	2
	Polónia	Chumbo	44	1
	Eslováquia	Chumbo	48	1
2007	Chipre	Chumbo	16	9
	Chipre	Mercúrio	16	2
	Dinamarca	Cádmio	28	1
	França	Chumbo	48	4

Tabela 8 (Continuação)

2006	Áustria	Chumbo	48	1
	Dinamarca	Chumbo	28	1
	França	Chumbo	47	3

4. Metodologias analíticas para deteção e determinação de contaminantes em mel

A deteção e determinação de contaminantes em mel requerem a aplicação de metodologias analíticas adequadas. Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas e aperfeiçoadas para uma melhor pesquisa destes compostos em mel e nos produtos alimentares em geral. A pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas em mel pode envolver uma fase inicial de deteção através de testes de rastreio (ELISA, Charm II e cromatografia em camada fina) mas a sua determinação é realizada através de técnicas cromatográficas (cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alta resolução). Para pesquisa de metais pesados em mel outras metodologias analíticas são aplicadas. As técnicas espectrofotométricas são as mais utilizadas na deteção e quantificação de metais pesados, a espectrometria de absorção atómica é a mais executada mas a espectrometria de emissão atómica também vem sendo aplicada.

Na determinação de contaminantes inorgânicos por métodos espectrofotométricos a amostra sólida deve ser transformada em solução aquosa para medição do analito. Existem três métodos de preparação da amostra: digestão ácida, digestão seca e dissolução por micro-ondas. Na digestão ácida, a amostra é submetida a uma digestão por ação de um ácido de forma a produzir uma solução. Os ácidos utilizados são, geralmente, o ácido clorídrico, ácido nítrico, ácido fluorídrico e ácido perclórico. No procedimento de digestão seca, a amostra sólida é inicialmente aquecida em mufla e posteriormente as cinzas resultantes são dissolvidas num ácido apropriado. Alguns elementos voláteis, como o mercúrio, arsénio e chumbo, podem perder-se durante esta técnica. Na dissolução por micro-ondas são adicionados ácidos à amostra e de seguida é colocada num forno de micro-ondas para dissolução.

4.1. Espectrometria de absorção atómica

A espectrometria de absorção atómica (AAS) baseia-se na absorção da radiação por átomos. Neste método analítico, a amostra é volatilizada (atomização da amostra) e os

átomos no estado gasoso absorvem energia radiante de comprimento de onda específico. A quantidade de energia absorvida é proporcional ao número de átomos no estado gasoso. Atualmente existem duas técnicas de AAS muito utilizadas na determinação de contaminantes (metais pesados) em géneros alimentícios: a espectrometria de absorção atómica por chama e a espectrometria de absorção atómica com forno de grafite (AAS-GF). Estes dois métodos analíticos diferem, sobretudo, na forma de atomização da amostra. Na AAS por chama, a atomização é conseguida com recurso a uma chama que atinge temperaturas elevadas (acima de 2000 K³). A chama produz-se pela combustão de um gás combustível (acetileno, hidrogénio ou propano) com um gás oxidante (ar, óxido nitroso ou oxigénio). A mistura de gases mais utilizada para determinação de metais é a de acetileno/ar. Na AAS-GF, a amostra é atomizada não com recurso a chama mas através de um tubo de grafite. Através do tubo passa uma corrente eléctrica que eleva a temperatura. A amostra é reduzida a cinzas e depois atomizada. A AAS-GF apresenta algumas vantagens em relação à AAS por chama: permite a análise de amostras mais pequenas, e em alguns casos, permite um aumento no limite de detecção, tornando-a uma técnica mais sensível. No entanto, o elemento a analisar pode perder-se na mineralização da amostra e a precisão é mais baixa. Existem metais pesados que requerem procedimentos analíticos com características especiais. É o caso do mercúrio, que requer uma técnica de vaporização a frio para atomização da amostra: o mercúrio é reduzido com boro-hidreto de sódio ou com cloreto de estanho, formando-se mercúrio elementar. A amostra é assim atomizada, passando posteriormente por uma corrente de árgon e depois pelo tubo de absorção. É o método da geração de hidretos.

4.2. Espectrometria de emissão atómica

Nesta metodologia analítica quando a amostra a analisar passa por uma fonte de energia, cada elemento (metal) produz um espectro de emissão característicos. Os espectros de emissão permitem a identificação de elementos já que cada elemento emite em comprimentos de onda definidos no espectro electromagnético. Na espectrometria de emissão atómica existem duas técnicas principais: a espectrometria de emissão por chama (fotometria de chama) (DCP-EAS) e a espectrometria de emissão atómica baseada em fontes de plasma (ICP-EAS). Na espectrometria de emissão atómica por chama a fonte de radiação é uma chama. A amostra entra no nebulizador e é transformada num fino aerossol, depois passa pela chama que a atomiza e excita, produzindo-se um espectro de emissão. Na ICP-AES, após a nebulização da amostra, a atomização é feita com recurso a fontes de

³ Kelvin: Unidade do Sistema Internacional (SI) para a grandeza temperatura. A sua conversão para a escala Celsius é feita através da fórmula $^{\circ}\text{C} = \text{K} - 273,15$.

plasma que promovem também a excitação dos átomos da amostra. O plasma é um gás ionizado (geralmente argon) e o processo de ionização pode ocorrer através de corrente eléctrica (plasma de corrente direta) ou através radiofrequência (plasma acoplado indutivamente). Na primeira a corrente eléctrica é gerada entre dois eléctrodos de grafite, enquanto que na segunda em três tubos concêntricos de sílica/quartzo. As fontes de plasma atingem temperaturas que rondam os 7000 e 15000 K. Os dois métodos analíticos apresentam diferenças: a DCP-AES tem limites de detecção inferiores à ICP-AES, e na primeira os eléctrodos de grafite exigem substituição frequente.

4.3. Validação de métodos quantitativos para detecção e quantificação de metais pesados

A validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar que o método utilizado é adequado à determinação do analito pretendido. Na validação pretende-se demonstrar que o método apresenta determinadas características através da avaliação de parâmetros específicos. Os parâmetros de validação geralmente avaliados nos métodos quantitativos são a exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e gama de trabalho (European Medicines Agency [EMA], 1995).

4.3.1. Exatidão

A exatidão avalia a proximidade entre o valor determinado num ensaio e o seu valor de referencia. Este parâmetro relaciona-se com os erros sistemáticos e aleatórios do método. Geralmente é avaliado através de ensaios de recuperação, que consistem na análise de nove determinações (no mínimo) de três concentrações diferentes, em triplicado. As três concentrações devem contemplar a gama de trabalho do método (EMA, 2011).

4.3.2. Precisão

A precisão avalia o grau de concordância entre repetidas medições de diferentes soluções obtidas da mesma amostra, sob as mesmas condições. Pode ser avaliada determinando a repetibilidade, a precisão intermédia ou a reprodutibilidade. A repetibilidade foi o parâmetro avaliado neste trabalho experimental, e exprime a precisão do método analítico em condições de trabalho idênticas, representando a concordância entre os resultados de medições sucessivas. De acordo com a *International Conference on Harmonization* deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o limite de variação do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) em triplicado, ou por seis determinações (em que a concentração média seja próxima do valor esperado) (EMA, 2011).

4.3.3. Especificidade/Seletividade

Quando um método analítico consegue discriminar com exatidão o analito de interesse na presença de substâncias interferentes (ex. impurezas, solventes residuais) diz-se que é seletivo/específico para esse composto (EMA, 2011). Os métodos espectrofotométricos são capazes de produzir resposta para uma única substância de interesse, devido ao uso de lâmpadas específicas que emitem radiação no comprimento de onda característico do elemento são designados específicos para esse elemento. Assim, para os métodos espectrofotométricos será mais indicado usar o termo especificidade. Por outro lado, os métodos seletivos produzem resposta para vários compostos químicos com uma característica em comum. Os métodos cromatográficos são métodos seletivos.

4.3.4. Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é mais pequena quantidade do composto a analisar, que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada. O limite de detecção é o quociente entre 3.3 vezes o desvio-padrão da regressão linear e o declive da curva de calibração (EMA, 2011).

4.3.5. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a mais pequena concentração do analito que pode ser quantificada, com uma determinada exatidão e precisão. O limite de quantificação é o quociente entre 10 vezes o desvio-padrão da regressão linear e o declive da curva de calibração (EMA, 2011).

4.3.6. Linearidade

A linearidade representa a aptidão do método de num determinado intervalo obter resultados diretamente proporcionais à concentração do elemento. Nos métodos espectrofotométricos são utilizadas soluções padrão (no mínimo, com 5 concentrações diferentes) e a absorção medida para cada resulta na obtenção da curva de calibração. A curva de calibração consiste assim numa representação gráfica entre a concentração do analito na solução e a absorção medida (EMA, 2011). O mel é uma matriz complexa e com composição variada, e muitas vezes desconhecida. Por esse motivo, a reprodução da matriz (mel) em soluções padrão é difícil, recorrendo-se muitas vezes à técnica da adição padrão para obtenção da curva de calibração. Nesta técnica à matriz (mel) adicionam-se soluções padrão com concentrações conhecidas (Mendham, Denney, Barnes & Thomas, 2002).

4.3.7. Gama de trabalho

É o intervalo entre a concentração mínima e a concentração máxima de analito que pode ser quantificada pelo método, e resulta geralmente de estudos de linearidade (EMA, 1995).

5. Os metais pesados e o seu impacto na saúde pública

Os metais pesados são compostos químicos que na sua forma pura exibem boa condutividade elétrica e térmica, elevada resistência, e pontos de fusão e ebulição elevados. A designação de “pesado” refere-se literalmente a um elevado número atómico, massa e gravidade específica (em relação à água). Estes compostos apresentam-se, à temperatura ambiente, na forma sólida com exceção do mercúrio. Os metais pesados podem ser considerados essenciais e não-essenciais aos seres vivos. Os metais pesados essenciais são parte constituinte dos organismos vivos e intervêm em funções biológicas. Estes elementos são considerados micronutrientes e possuem um papel essencial na nutrição humana. No entanto, metais pesados essenciais como o cobre, magnésio e fósforo, podem causar toxicidade quando ingeridos em doses superiores às recomendadas. Por outro lado, os metais pesados não-essenciais, como o cádmio, chumbo e mercúrio, não são parte constituinte dos seres vivos e causam toxicidade por apresentarem estruturas químicas semelhantes aos metais essenciais, mimetizando e substituindo estes em inúmeras reações enzimáticas e processos metabólicos. Por exemplo, o cádmio substitui o zinco em reações enzimáticas e o chumbo interfere no metabolismo do cálcio.

Os metais pesados existem naturalmente na crosta terrestre e entram nos ciclos biológicos através de fenómenos naturais (erosão rochosa, erupções vulcânicas) e atividades antropogénicas (combustíveis fósseis, atividade industrial). Estes compostos circulam e depositam-se nos diversos compartimentos ambientais (solo, água e ar), entram nos ecossistemas e afetam organismos terrestres e aquáticos. No solo, muitos metais são convertidos por microrganismos na sua forma orgânica e são captados pelas plantas. Nas plantas concentram-se essencialmente nas folhas e são ingeridos posteriormente por outros animais (aves, ovinos, caprinos), resultando na sua entrada na cadeia alimentar. Alguns metais pesados, como o chumbo, apresentam elevada mobilidade no solo e entram nos lençóis freáticos. No meio aquático, permanecem sob a forma de partículas por várias décadas, depositam-se nos sedimentos e são bioconcentrados pelos organismos aquáticos. A entrada destes elementos no meio aquático resulta na contaminação de peixes e especialmente de moluscos. O poder de bioconcentração varia com as espécies, ocorre em ambiente aquático e terrestre, e em cada indivíduo varia nos diferentes órgãos. Alguns

metais pesados sofrem biomagnificação, ou seja, verifica-se a acumulação destes compostos ao longo da cadeia alimentar. O fenómeno de biomagnificação assume, assim, elevado risco para os animais no topo da cadeia (como o homem, ou as aves predadoras) e a sua magnitude varia com o tipo de metal pesado. Para certos metais o processo de biomagnificação ao longo da cadeia alimentar é elevado (cádmio), enquanto que para outros é reduzido (chumbo).

5.1. Chumbo

O chumbo é um metal e surge no ambiente sob a forma orgânica e inorgânica. Em 2006, a *International Agency for Research on Cancer* classificou o chumbo inorgânico no Grupo 2A como *provavelmente carcinogénico* para humanos. A *provisional tolerable weekly intake* de chumbo é de 25 µg/kg de peso corporal para crianças e adultos (WHO, 2011).

5.1.1. Fontes de exposição

A exposição humana ocorre através da alimentação, ar, solo e poeiras. A alimentação representa a principal fonte de exposição. No entanto outros factores de risco como combustíveis fósseis, cerâmicas, vidro, soldagem, baterias e tintas são assinalados.

5.1.2. Toxicocinética

5.1.2.1. Absorção e distribuição

O chumbo ingerido é absorvido no aparelho digestivo, através de um processo de absorção ativa mediado por proteínas envolvidas no transporte de cálcio na mucosa gastrointestinal. A absorção deste metal pesado a nível gastrointestinal varia com diversos fatores, tais como o tamanho das partículas ingeridas (é inversamente proporcional ao tamanho das partículas), a duração do trânsito gastrointestinal, o estado nutricional e a idade (Shannon, Borron, & Burns, 2007).

Após ser absorvido o chumbo entra na corrente sanguínea e a sua distribuição no organismo obedece a um modelo tricompartmental. Cerca de 95% do chumbo presente no sangue encontra-se ligado aos eritrócitos, e o tempo de semivida neste compartimento é de 30 dias, difundindo-se de seguida para diferentes tecidos, como o fígado, rins, medula óssea e cérebro. O chumbo permanece aproximadamente um a dois meses nestes tecidos, causando toxicidade celular. Após este período difunde-se para o tecido ósseo onde é depositado e onde permanece durante 10 a 30 anos (EFSA, 2010). No tecido ósseo e dentes o chumbo é considerado inerte e não tóxico, mas diversos fatores estão associados

à sua mobilização e consequente reentrada na corrente sanguínea (gravidez, pacientes acamados, medicação, tirotoxicose).

A absorção por inalação de partículas contendo chumbo é influenciada pelo seu tamanho e solubilidade. Partículas de dimensões superiores a 5 µm depositam-se na traqueia e brônquios, são transportadas pelo muco e epitélio ciliar até à faringe e posteriormente ingeridos e absorvidos via gastrointestinal. As partículas de dimensões inferiores depositam-se na árvore respiratória sendo absorvidas após dissolução extracelular ou ingestão por macrófagos alveolares (EFSA, 2010).

A absorção dérmica de chumbo na forma orgânica por via dérmica assume valores baixos (0,06%), e a exposição ocorre através de preparações contendo chumbo.

5.1.2.2. Eliminação

O chumbo não absorvido por via gastrointestinal é excretado nas fezes, enquanto o chumbo absorvido mas não distribuído por outros tecidos é eliminado via renal (cerca de 30 µg/dia) e por *clearance* biliar (WHO, 2000).

5.1.3. Toxicidade

O chumbo é um contaminante ambiental com efeitos tóxicos em diversos sistemas de órgãos. O rim, o sistema hematopoiético e o sistema nervoso estão entre os mais afetados.

Sistema hematopoiético. O sistema hematopoiético é um dos sistemas mais sensíveis ao chumbo. Este metal pesado tem elevada afinidade para os grupos sulfidrilo das metaloenzimas, as quais estão envolvidas na síntese do grupo heme. Assim, a atividade de enzimas como o ácido δ-aminolevulínico (ALA) desidratase, a coproporfirinogénio (COPRO) III oxidase e a ferroquelatase são afetadas. Quando a concentração sanguínea de Pb é de 5 µg/dl a atividade do ácido δ-aminolevulínico desidratase é inibida levando à acumulação do ácido δ-aminolevulínico, uma suposta neurotoxina. A elevação da protoporfirina eritrocitária verifica-se a níveis sanguíneos de Pb da ordem dos 15-25 µg/dl, a redução da hemoglobina produzida quando este valor atinge os 50 µg/dl, e anemia a 80 µg/dl (Shannon *et al.*, 2007)

Toxicidade renal. A nível renal o chumbo interfere na conversão da 25-vitamina D em 1,25-vitamina D, alterando a atividade da hidroxilase envolvida na reação. Outro dos efeitos tóxicos apontados é uma tubulopatia caracterizada por proteinúria. Em adultos, níveis sanguíneos de Pb baixos (40 µg/dl) estão associados ao aparecimento de inclusões intranucleares nos túbulos renais, e níveis elevados (100-120 µg/dl) a nefropatia crónica. Os

estados avançados de nefropatia por Pb são caracterizados por fibrose intersticial e atrofia tubular (Shannon *et al.*, 2007).

Toxicidade neurológica. A exposição ao chumbo vem sendo relacionada à diminuição do desempenho cognitivo, e em indivíduos de idade avançada a manifestações de disfunção neurocomportamental associadas a doenças neurodegenerativas (Weiss, 2010). A inibição de enzimas (calmodulina, piruvato cinase, entre outras) essenciais à função neuronal pelo Pb afeta a produção de neurotransmissores, mas as interferências do Pb nas funções celulares que requerem cálcio e zinco parecem estar na origem de muitos dos efeitos neurotóxicos deste metal. Ao nível do sistema nervoso periférico produz-se uma axonopatia que resulta em distúrbios motores, esta axonopatia observa-se com maior prevalência nos membros superiores, nos músculos extensores e no membro dominante.

Toxicidade aguda por chumbo em adultos. A toxicidade aguda por chumbo em adultos é rara, ocorrendo mais frequentemente toxicidade por exposição crónica. A DL₅₀ oral para sais de chumbo em modelos animais varia entre 300 e 4000 mg/kg (EFSA, 2010). Os quadros clínicos caracterizam-se por fadiga, irritabilidade, letargia, insónia, cefaleias, concentração reduzida, perda de memória, tremor, mialgias, vômito, obstipação e perda da libido. Os casos mais severos apresentam também encefalopatia caracterizada por convulsões, edema cerebral e coma, sendo fatal em 25% dos casos.

Toxicidade aguda por chumbo em crianças. Em crianças, a toxicidade aguda por chumbo desenvolve-se em níveis sanguíneos iguais ou superiores a 10 µg/dl e ocorre essencialmente por ingestão (Shannon *et al.*, 2007).

5.1.4. Legislação referente ao chumbo na alimentação

O chumbo é um metal tóxico para o meio ambiente e que coloca em risco a saúde pública. Assim, diversas peças legislativas comunitárias e nacionais regulam a sua utilização.

Legislação Comunitária:

- **Regulamento (CE) nº 1881/2006, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de Dezembro de 2006**, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios.
- **Regulamento (CE) nº 333/2007, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Março de 2007**, que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio, mercúrio, estanho na forma inorgânica, 3-MCPD e benzo(a)pireno nos géneros alimentícios.

- **Diretiva nº 98/83/EC, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 3 de Novembro de 1998**, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. São estabelecidos os limites máximos de chumbo, cádmio, cobre, entre outros.
- **Diretiva nº 2003/40/EC, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Maio de 2003**, que estabelece a lista, os limites de concentração e as menções constantes do rótulo para os constituintes das águas minerais naturais.
- **Diretiva nº 2005/87/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de Dezembro de 2005**, que altera o anexo I da Diretiva nº 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais, no que respeita ao chumbo, flúor e cádmio.
- **Diretiva nº 2005/31/CE, da Comissão, de 29 de Abril de 2005**, que altera a Diretiva nº 84/500/CEE do Conselho no que diz respeito à declaração de conformidade e aos critérios de desempenho do método analítico relativamente a objetos cerâmicos destinados a entrar em contacto com os géneros alimentícios, estabelecendo no Anexo I métodos de análise para a determinação da cedência de chumbo e cádmio.

Legislação Nacional:

- **Decreto-Lei nº 187/2005, publicado em Diário da República II série, de 4 de Novembro de 2005, nº 212**, altera o Decreto-Lei nº 269/2002, transpões para a ordem jurídica interna a Diretiva nº 2005/4/CE, da Comissão, de 19 de Janeiro, que altera a Diretiva nº 2001/22/CE, da Comissão, de 8 de Março, que estabelece os métodos de colheita de amostras e de análise para o controlo oficial dos teores de chumbo, cádmio e 3-MPCD presentes nos géneros alimentícios.

5.2. Cádmio

O cádmio é encontrado de forma natural na atmosfera, na crosta terrestre e na água do mar. É um metal branco azulado, e apresenta-se no estado sólido à temperatura ambiente. O cádmio foi classificado como agente carcinogénico pela IARC, em 1993. Este metal pesado foi incluído no Grupo I como *agente (mistura) carcinogénico para humanos*, por existirem evidências suficientes da sua carcinogenicidade. Devido aos seus efeitos tóxicos, a FAO/WHO estabeleceu para este metal uma PTWI de 7 µg/kg de peso corporal (WHO, 2011).

5.2.1. Fontes de exposição

A exposição ao cádmio pode ocorrer por inalação ou por ingestão. A contaminação ambiental está na origem da exposição humana a este metal pesado. O cádmio é um dos metais pesados presentes no fumo dos cigarros, existindo uma variação importante quanto à exposição ao cádmio entre indivíduos fumadores e não fumadores. Nos indivíduos não fumadores, 90% da exposição ocorre por via alimentar e os restantes 10% por inalação de cádmio do ar ambiente e pela água de bebida (EFSA, 2009).

A concentração urinária de cádmio é o biomarcador que melhor reflete a concentração corporal total deste metal e a quantidade armazenada nos rins de cada indivíduo, sendo um biomarcador que retrata também a exposição crónica ao cádmio (Gallagher, Kovach & Meliker, 2008). Por outro lado, a concentração de cádmio no sangue é o biomarcador mais adequado para exposições recentes (EFSA, 2009).

5.2.2. Toxicocinética

5.2.2.1. Absorção e distribuição

A absorção gastrointestinal de cádmio é, em média, cerca de 5%, verificando-se uma variação individual que pode ir de 1% a 20% (WHO, 2004b). A absorção de cádmio varia com o sexo, sendo de 5% nos homens enquanto nas mulheres pode atingir valores de 10%. Assim, as mulheres apresentam níveis de cádmio mais elevados que os homens. A nível intestinal, o transportador DMT1 é responsável pela absorção de cádmio e é também o principal transportador de ferro. A deficiência em ferro estimula o funcionamento do transportador, aumentando assim a absorção de cádmio (Menke, Muntner, Silbergeld, Platz, & Guallar, 2009). Desta forma, os reduzidos níveis de ferro nas mulheres levam a maior absorção de cádmio tornando-as, provavelmente, indivíduos mais suscetíveis em iguais condições de exposição (Gallagher, Chen, & Kovach, 2010).

A absorção por inalação de cádmio ocorre de 7 a 50% da porção inalada (EFSA, 2009). Diversos estudos demonstraram existirem diferenças na concentração sanguínea de cádmio entre fumadores e não fumadores, sendo mais elevada no primeiro grupo, realçando a importância da absorção por via respiratória deste metal (Navas-Acien *et al.*, 2009; Ferraro, Constanzi, Naticchia, Sturniolo, & Gambaro, 2010).

O cádmio absorvido no duodeno entra na corrente sanguínea, liga-se à albumina sérica e é depois armazenado no fígado onde se liga à metalotioneína-1. O complexo Cd-metalotioneína-1 é transportado até aos rins, filtrado pelos glomérulos e reabsorvido de seguida no túbulo proximal, permanecendo armazenado no interior das células tubulares (Ferraro *et al.*, 2010).

5.2.2.2. Eliminação

Ensaios em roedores demonstraram que aproximadamente 90% do cádmio ingerido não é absorvido, sendo eliminado diretamente nas fezes. O cádmio absorvido é conjugado no fígado e uma pequena parte excretada por via biliar novamente para o trato intestinal, e posteriormente eliminado nas fezes (WHO, 2004b).

A taxa de eliminação diária de cádmio via urinária é de 0,001% (Satarug & Moore, 2004; McElroy, Shafer, Trentham-Dietz, Hampton & Newcomb, 2006), no entanto a eliminação de cádmio tende a aumentar à medida que os efeitos nefrotóxicos são exercidos no tecido renal.

Apenas uma reduzida percentagem de cádmio absorvido é eliminada, resultando no armazenamento deste metal pesado no organismo.

5.2.3. Toxicidade

Toxicidade Renal. O cádmio é um contaminante ambiental com conhecidos efeitos nefrotóxicos. A exposição crónica ao cádmio resulta em acumulação intracelular nos túbulos proximais renais, onde permanece por algumas décadas (semivida de 10-30 anos) (Satarug & Moore, 2004). Quando a concentração intracelular de cádmio ultrapassa os 150-200 µg/g no tecido renal, a função do túbulo proximal é afetada (Edwards & Prozialeck, 2009).

As lesões renais induzidas pelo cádmio manifestam-se, inicialmente, por proteinúria. São excretadas, essencialmente, proteínas de baixo peso molecular, como a α_1 -microglobulina, a proteína transportadora de retinol e a enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase. Se a exposição continuada ao cádmio se verificar, a lesão tubular progride para lesão glomerular e eventualmente para insuficiência renal (Thomas, Hodgson, Nieuwenhuijsen & Jarup, 2009).

A relação entre a exposição a baixos níveis de cádmio e a presença de lesões tubulares e glomerulares tem sido demonstrada em diversos estudos. Akesson *et al.* (2005) demonstraram que níveis sanguíneos e urinários baixos de cádmio estão associados à presença de marcadores de lesão renal (N-acetil- β -D-glucosaminidase) na urina. Navas-Acien *et al.* (2009) demonstraram que indivíduos com aumento da concentração sanguínea de cádmio apresentavam albuminúria e redução da taxa de filtração glomerular.

Toxicidade óssea. A toxicidade óssea associada à exposição de cádmio manifesta-se pela diminuição da formação óssea e pelo aumento da desmineralização, resultando numa reduzida densidade do tecido e no aumento da incidência de fraturas (Bhattacharyya, 2009).

A fisiopatologia da toxicidade óssea pelo cádmio ainda não é clara e diversos mecanismos parecem interferir indiretamente. Estes mecanismos envolvem a diminuição da ativação da

vitamina D, interferências na absorção intestinal de cálcio e diminuição da estimulação da paratormona a nível renal. Por outro lado, a nefrotoxicidade induzida pelo cádmio poderá também estar associada indiretamente à redução do conteúdo mineral do tecido ósseo. A disfunção tubular renal poderá levar a hipercalcúria, potenciando a desmineralização e a redução da densidade óssea (Gallagher *et al.*, 2008). No entanto, diversos estudos vêm demonstrando que a desmineralização óssea induzida pela exposição ao cádmio pode ocorrer na ausência de disfunção renal, através de um processo de toxicidade óssea direto. Diversas hipóteses tentam explicar a base molecular deste processo induzido pelo cádmio. Muitas alterações têm sido verificadas em osteoblastos e que podem estar na sua origem: aumento da prostaglandina E₂ (secundário ao aumento na expressão da fosfolipase A₂ e ciclooxigenase); aumento da atividade da caspase-3 e alterações nucleares características de apoptose (marginalização e condensação de cromatina, e fragmentação de ADN) (Schutte *et al.*, 2008).

No Japão, foi descrito o mais grave caso de toxicidade óssea pelo cádmio. A poluição do rio Jinzu pela atividade mineira, na província de Toyama, levou à contaminação de alimentos e água de bebida. A exposição prolongada das populações a alimentos contaminados com cádmio levou ao aparecimento de múltiplas fraturas e distorção dos ossos longos, causando dor intensa aos indivíduos afetados. A doença ficou conhecida como doença *Itai-Itai*, e caracterizava-se por lesões mistas de osteomalacia, osteoporose e lesão renal (EFSA, 2009).

Carcinogénese. Diversos estudos demonstraram existir uma relação entre a exposição ao cádmio e o aumento na incidência de diversas formas de cancro em humanos. O poder carcinogénico do cádmio foi demonstrado também em ensaios em animais. Quer a inalação quer a administração parentérica de cádmio em ratos resultaram no aparecimento de múltiplas formas cancerígenas (IARC, 1997).

O cádmio como potencial fator de risco na carcinogénese continua a ser alvo da comunidade científica e inúmeros estudos aportam evidências desta relação. Estudos epidemiológicos vêm relacionando a exposição ao cádmio ao aumento da incidência de cancro de pulmão, demonstrando que populações em áreas poluídas são mais afetadas (Nawrot *et al.*, 2006).

O cádmio parece constituir também um importante fator de risco ambiental no cancro de mama. Na glândula mamária, este metal pesado une-se aos recetores de estrogénio e impede a reparação das moléculas de ADN (McElroy *et al.*, 2006; Gallagner *et al.*, 2010).

Elevadas concentrações tissulares de cádmio têm sido também detetadas em pacientes com cancro de próstata (Ferris *et al.*, 2011).

Outros efeitos tóxicos. Vários estudos apontam o cádmio como diabetogénico, podendo ser considerado um fator de risco ambiental no desenvolvimento da *diabetes mellitus* em humanos (Schwartz, Il'yasova & Ivanova, 2003; Chen *et al.*, 2009). O cádmio pode atuar em diferentes órgãos e alterar o metabolismo da glucose, levando a hiperglicémia. Existem atualmente evidências da citotoxicidade do cádmio nas células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas, influenciando os níveis de insulina libertados por este órgão. No fígado, doses sub-crónicas de cádmio aumentaram a atividade de quatro das enzimas envolvidas na gluconeogénese. O cádmio induz também a lipogénese, e no tecido adiposo mimetiza o efeito da insulina. Na glândula adrenal, é responsável pelo aumento da libertação de catecolaminas, e consequentemente pelo aumento da glicemia (Edwards & Prozialeck, 2009).

A exposição crónica ao cádmio é associada a doenças cardiovasculares como a hipertensão e a cardiomiopatia. O cádmio provoca lesão das células do endotélio vascular, quebrando as junções intercelulares e aumentando a permeabilidade dos vasos. O edema e a hemorragia são consequência direta deste efeito. Este metal pesado exerce ainda efeitos na angiogénese e na remodelação vascular (Prozialeck *et al.*, 2008).

Toxicidade aguda por cádmio. A DL_{50} de cádmio em roedores é de 100 a 300 mg/kg (WHO, 2004b). A dose letal por ingestão de cádmio é de 350 a 8900 mg (ASAE, 2009), e a sintomatologia da toxicidade aguda é hipersíalía, náuseas, dor abdominal e diarreia. A inalação aguda de elevada concentração deste metal pesado causa pneumonia, podendo em alguns casos ser fatal. Não existe, até ao momento, tratamento para a toxicidade aguda por cádmio. Diversos agentes quelantes têm sido testados em animais, mas nenhum se mostrou eficaz em humanos.

5.2.4. Legislação referente ao cádmio na alimentação

A legislação comunitária e nacional que regulamenta a utilização de cádmio é equivalente à exposta anteriormente para o chumbo.

5.3. Cobre

O cobre é um metal de cor avermelhada e encontra-se no estado sólido à temperatura ambiente. Na sua forma metálica é maleável, dútil, e bom condutor elétrico e térmico. É utilizado no fabrico de cabos elétricos, canos, utensílios de cozinha, moedas e constituinte de fertilizantes agrícolas e suplementos da alimentação animal. Na alimentação humana é

considerado um micro nutriente, parte importante de uma alimentação equilibrada, e a dose diária recomendada para um adulto é de 5 mg (EFSA, 2006).

5.3.1. Fontes de exposição

As fontes de exposição ao cobre são, quase exclusivamente, através da alimentação e água de bebida.

O teor em cobre dos alimentos é variável. Os alimentos com elevado teor em cobre são marisco, vísceras animais, nozes e sementes. No entanto, os cereais e produtos integrais são também considerados boas fontes nutricionais de cobre (EFSA, 2006). O teor em cobre em fígado pode variar entre 9,0 e 97 mg/kg p.s., em rim os valores podem variar entre 3,7 e 6,1 mg/kg p.s. e em farinha e pão de trigo os valores médios são 1,5 mg/kg p.s. (WHO, 1998). Na União Europeia, o consumo de cereais em adultos e crianças é uma importante fonte de exposição alimentar ao cobre, seguindo-se a carne em adultos e os vegetais e confeitaria nas crianças. Diversos estudos têm avaliado a dose diária ingerida de cobre em adultos nos diversos Estados membros da União Europeia. A dose média diária para a população europeia é de 0,8 a 1,8 mg de cobre/dia (Sadhra, Wheatley & Cross, 2007). A dieta vegetariana aporta maiores conteúdos em cobre, cerca de 2,1 a 3,9 mg/dia (EFSA, 2006).

A concentração de cobre na água de bebida varia de acordo com o pH e dureza da água, e pela presença de sistemas de distribuição ricos em cobre. O processo de corrosão destes sistemas é apontado como a principal causa do aumento do teor em cobre na água. Os níveis de cobre na água de bebida podem variar entre $\leq 0,005$ e >30 mg/l. De uma forma geral, cada indivíduo ingere, em média, entre 0,1 e 1 mg/dia de cobre na água de bebida (WHO, 2004a).

A exposição por inalação ao cobre pode ocorrer através de fumos, poeiras e *sprays* contendo cobre.

5.3.2. Toxicocinética

5.3.2.1. Absorção e distribuição

O cobre ingerido é absorvido principalmente na porção proximal do intestino delgado e apenas uma pequena percentagem no estômago. Cerca de 75% do total ingerido é absorvido. A absorção intestinal deste metal pesado não é totalmente clara, mas até ao momento evidências sugerem que um processo ativo ocorre em dietas baixas em cobre, e um processo de difusão passiva em dietas com alto teor em cobre (EFSA, 2006). A taxa de absorção de cobre varia inversamente com o teor em cobre ingerido (Lönnerdal, 2008). O

complexo mecanismo de homeostase do cobre permite ao organismo adaptar-se, e quando doses excessivas são ingeridas a fração absorvida é reduzida (Uauy, Maass & Araya, 2008).

A absorção pelos enterócitos envolve, provavelmente, uma proteína com alta afinidade para o cobre, a hCtr1. No entanto o transportador DMT1, responsável pelo transporte de ferro, também parece estar envolvido (Roberts & Sarkar, 2008).

Na dieta, o cobre existe na forma de Cu^{2+} . No entanto, apenas a forma iônica Cu^+ é transportada pela membrana apical dos enterócitos. Desta forma, antes do processo de absorção o cobre, na forma Cu^{2+} , é reduzido, assumindo a forma iônica de Cu^+ .

O cobre absorvido, na forma de Cu^+ , liga-se a proteínas de baixo peso molecular no interior das células, as quais são responsáveis pela sua distribuição intracelular (Roberts & Sarkar, 2008). A ligação do cobre a estas proteínas impede que reações de oxidação-redução $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ocorram, e consequentemente que se inicie a produção de radicais livres. A presença de radicais livres na célula resulta em lesão mitocondrial, com rotura das moléculas de ADN (Desai & Kaler, 2008; Huster, 2010).

O cobre absorvido entra na circulação sanguínea, liga-se reversivelmente à albumina sérica e à histidina (na forma Cu^{2+}), e é distribuído a diversos tecidos e órgãos, principalmente para o fígado. No fígado, o mais importante órgão da homeostase do cobre, é reduzido a Cu^+ e transportado para o interior dos hepatócitos pela hCtr1 (Roberts & Sarkar, 2008). Nos hepatócitos é incorporado nas cuproenzimas, ceruloplasmina, superóxido dismutase e citocromo oxidase, e o cobre em excesso incorporado à metalotioneína. Na circulação sanguínea pós-hepática, 75% do cobre encontra-se ligado à ceruplasmina (WHO, 2004a).

5.3.2.2. Eliminação

A excreção de cobre ocorre essencialmente por via biliar. Embora o mecanismo fisiológico deste processo não seja claro, parece ocorrer por duas vias distintas: através do transporte membranário canalicular do complexo Cu-glutationa, ou pelo transporte vesicular do cobre para a via biliar. A eliminação urinária de cobre é residual, já que o complexo Cu-ceruplasmina que atinge o glomérulo renal não é filtrado através dos capilares glomerulares (Fuentealba & Aburto, 2003).

5.3.3. Toxicidade

Quando indivíduos saudáveis ingerem uma dieta equilibrada, os fenómenos de toxicidade ou deficiência são raros. Metabolicamente, cada indivíduo é capaz de compensar a ingestão

excessiva ou deficiente de pequenas quantidades de cobre. No entanto, quando são ingeridas doses tóxicas desenvolvem-se quadros clínicos de toxicidade.

Toxicidade aguda. A toxicidade aguda por ingestão de cobre é rara em humanos, e geralmente ocorre como consequência da contaminação alimentar (EFSA, 2006). Em adultos, a dose letal por ingestão aguda de cobre é de 4 a 400 mg/kg. A ingestão de doses elevadas de Cu^{2+} leva a hemorragia gastrointestinal, hemólise intravascular, metahemoglobinemia, toxicidade hepatocelular, hematúria, oligúria e insuficiência renal aguda (WHO, 2004a).

Diversos estudos demonstraram que a ingestão excessiva de cobre na água de bebida causa sintomatologia gastrointestinal, como náusea, vômito, diarreia e dor abdominal. O cobre é irritante para a mucosa gastrointestinal e/ou altera a microflora do cólon. Estes sintomas foram observados em indivíduos ingerindo <0,01 mg Cu/l, 2 mg Cu/l, 4 mg Cu/l e 6 mg Cu/l, ocorrendo mais intensamente no último grupo (Pizarro, Olivares, Araya, Gidi & Uauy, 2001; Araya *et al.*, 2003).

Toxicidade crônica. São raras as referências na bibliografia quanto a este tipo de toxicidade. A toxicidade crônica por ingestão de cobre pode causar lesão hepática, renal, anemia e imunotoxicidade, por lesão oxidativa das membranas e macromoléculas celulares (Cockell, Bertinato & L'Abbé, 2008; Tchounwou, Newsome, Williams & Glass, 2008). A toxicidade hepática pelo cobre está bem caracterizada em determinadas síndromes, como a Doença de Wilson, a Cirrose Infantil Indiana e a Toxicose Idiopática.

Doença de Wilson. A doença de Wilson é uma doença hereditária autossômica recessiva do metabolismo do cobre, caracterizada pela disfunção da ATPase tipo-P1, ATP7B. Esta proteína transportadora do cobre localiza-se nos hepatócitos, e é a proteína central da homeostase do cobre no fígado, a sua disfunção impede a excreção do cobre em excesso levando a toxicidade. O quadro clínico desta patologia é caracterizado essencialmente por doença hepática (aumento das enzimas hepáticas, hepatite crônica com esteatose e fibrose, cirrose hepática e insuficiência hepática crônica), doença neurológica (tremores posturais, rigidez, distonia, disartria, disfagia, depressão) e presença do anel de Kayser-Fleischer (deposição granular de cobre na córnea) (Huster, 2010).

Toxicose Idiopática. A toxicose idiopática ao cobre caracteriza-se por fibrose e cirrose hepática resultantes da acumulação deste metal pesado no fígado. A etiologia desta síndrome não é conhecida, mas estudos epidemiológicos sugerem uma alteração genética, autossômica recessiva, no metabolismo do cobre. No entanto, fatores ambientais, como a exposição a elevadas doses de cobre, assumem também um papel determinante (Vonk, Wijmenga & Sluis, 2008).

Cirrose Infantil Indiana. Esta síndrome foi descrita inicialmente na Índia, e a sua etiologia é desconhecida. No entanto a associação de fatores genéticos e ambientais parece provável. Clinicamente caracterizou-se por doença hepática fatal, e esteve associada à ingestão de leite com elevado teor em cobre (Uauy *et al.*, 2008).

5.3.4. Legislação referente ao cobre na alimentação

Legislação Comunitária:

- **Regulamento (CE) nº 1925/2006 de 20 de Dezembro, do Parlamento Europeu e do Conselho**, relativo à adição de vitaminas, minerais e de determinadas substâncias aos alimentos, alterado pelo Regulamento (CE) nº 108/2008 de 15 de Janeiro, pelo Regulamento (CE) nº 1170/2009 de 30 de Novembro, e pelo Regulamento (CE) nº 1161/2011 de 14 de Novembro.
- **Regulamento (CE) nº 953/2009 de 13 de Outubro, da Parlamento Europeu e da Comissão**, que estabelece as regras sobre as substâncias que podem ser adicionadas, para fins nutricionais específicos, aos géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial, alterado pelo Regulamento (CE) nº 1161/2011 de 14 de Novembro.

Legislação Nacional:

- **Decreto-Lei nº 136/2003 de 28 de Junho, publicado em Diário da República I série - A, nº 147**, alterado pelo Decreto-Lei nº 296/2007 de 22 de Agosto, transpõe para o direito nacional a Diretiva nº 2002/46/CE de 10 de Junho, do Parlamento Europeu e do Conselho, relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares, alterada pela Diretiva nº 2006/37/CE de 30 de Março da Comissão, pelo Regulamento (CE) nº 1170/2009 de 30 de Novembro, e pelo Regulamento (CE) nº 1161/2011 de 14 de Novembro.
- **Decreto-Lei nº 72/2004 de 25 de Março, publicado em Diário da República I série - A, nº 72**, que transpõe a Diretiva nº 2003/40/CE de 16 de Maio, da Comissão, que define a lista, os limites de concentração e as menções constantes do rótulo para os constituintes das águas minerais naturais.
- **Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, publicado em Diário da República I série, nº 164**, que define a qualidade da água destinada ao consumo humano.
- **Decreto-Lei nº 53/2008 de 25 de Março, publicado em Diário da República I série, nº 59**, transpõe para o direito nacional a Diretiva nº 2006/125/CE de 5 de

Dezembro, da Comissão, relativa a alimentos à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e a crianças de pouca idade.

- **Decreto-Lei nº 217/2008 de 11 de Novembro, publicado em Diário da República I série, nº 219**, transpõe a Diretiva nº 2006/141/CE de 22 de Dezembro, da Comissão, relativa às fórmulas para lactentes e fórmulas de transição.
- **Decreto-Lei nº 216/2008 de 11 de Novembro, publicado em Diário da República I série, nº 219**, aplica à ordem jurídica nacional a Diretiva nº 1999/21/CE de 25 de Março, da Comissão, que estabelece as regras para os alimentos dietéticos destinados a fins medicinais específicos, alterada pela Diretiva nº 2006/141/CE, da Comissão, de 22 de Dezembro.
- **Decreto-Lei nº 81/2010 de 30 de Junho, publicado em Diário da República I série, nº 125**, transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva nº 1996/8/CE de 26 de Fevereiro, da Comissão, referente aos alimentos destinados a serem utilizados em dietas de restrição calórica para redução de peso, alterada pela Diretiva nº 2007/29/CE, da Comissão, de 30 de Maio.

Face ao exposto nesta revisão bibliográfica, os metais pesados entram nos ecossistemas através de diversas fontes (naturais e/ou antropogénicas), permanecendo nos ciclos biológicos e seres vivos durante longos períodos de tempo. A sua entrada na cadeia alimentar constitui um risco para os elementos que a integram, em particular para o Homem e animais predadores. Assim, a monitorização das concentrações dos metais pesados nos géneros alimentícios é de vital importância. Neste trabalho experimental foi realizada a deteção e quantificação de metais pesados em mel, um alimento considerado “natural” pela maioria dos consumidores.

CAPITULO - II. PROJETO EXPERIMENTAL

1. Objetivo

Os objetivos deste trabalho experimental foram a otimização e validação do método espectrofotométrico de absorção atômica por chama para detecção e quantificação de metais pesados (chumbo, cádmio e cobre) em amostras de mel nacional, e a comparação dos resultados obtidos em mel nacional de diferentes origens geográficas.

2. Desenho experimental

2.1. Desenvolvimento do método de extração de Cu, Cd e Pb em amostras de mel

Para extração de Cu, Cd e Pb nas amostras de mel foram testados dois métodos de extração, o de digestão ácida e o de digestão seca. Para avaliação dos dois métodos foram fortificadas amostras de mel com concentrações conhecidas dos metais em estudo, em triplicado. Os procedimentos utilizados foram:

- a) No método de digestão ácida pesaram-se 5 g de mel em cadinho de porcelana, adicionaram-se 5 ml de ácido nítrico (HNO_3 a 65%), e deixou-se repousar durante 24 horas. As amostras foram posteriormente aquecidas em placa eléctrica, a 100°C , até se obter a evaporação do ácido.
- b) No método de digestão seca foram pesadas 5 g de mel num cadinho de porcelana e colocadas em estufa, a 100°C durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram aquecidas em mufla, a 500°C durante 16 horas. Às cinzas resultantes adicionaram-se 2 ml de ácido nítrico (HNO_3 a 65%), e de seguida a evaporação do ácido foi conseguida pelo aquecimento das amostras em placa eléctrica.

Para ambos os métodos de extração, após a evaporação do ácido nítrico em placa eléctrica as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, e perfez-se com água destilada. A leitura das amostras foi realizada por espectrometria de absorção atômica por chama. Para cada um dos métodos utilizou-se uma amostra sem fortificação (“branco”).

2.2. Validação do método espectrofotométrico de absorção atômica por chama para detecção e quantificação de metais pesados (chumbo, cádmio e cobre) em mel nacional

Para validação da metodologia analítica avaliaram-se diferentes parâmetros de validação: linearidade, exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade), limite de detecção e limite de

quantificação, especificidade e gama de trabalho. A avaliação destes parâmetros consistiu na fortificação de amostras de mel com diferentes concentrações de Cu, Pb e Cd.

2.2.1. Material e métodos

2.2.1.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: água desionizada, ácido nítrico (J.T. Baker, 6080), padrões de cobre (Fluka chemika, 61147), cádmio (Fluka chemika, 20895) e chumbo (Fluka chemika, 15314). A água desionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore®.

2.2.1.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram os seguintes: balança digital (Precisa 125 A, Max=100 g, 0,0001 mg), estufa (MELAG), muflas (Nabertherm, 30-3000°C), espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer Analyst 700) com queimador de chama ar/acetileno (17/2 ml/min), lâmpadas de cátodo oco como fonte de emissão e comprimentos de onda de 324,8 nm para Cu, 228,8 nm para Cd e 283,3 nm para Pb.

2.2.2. Procedimento Experimental

2.2.2.1. Preparação das amostra

As amostras de mel fortificadas na validação do método analítico (espectrometria de absorção atômica por chama) foram preparadas através do método de digestão seca.

2.2.2.2. Avaliação dos parâmetros de validação do método espectrofotométrico de absorção atômica por chama

2.2.2.2.1. Linearidade e gama de trabalho

As curvas de calibração foram obtidas pela leitura de soluções de concentrações conhecidas dos metais pesados em análise. Obtiveram-se soluções padrão de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 5 e 10 µg/ml de cada metal (1000 µg/ml), adicionou-se água destilada e 2 ml de ácido nítrico (HNO₃ a 65%) em balões de 100 ml. A leitura (em triplicado) das soluções padrão foi posteriormente feita no espectrofotômetro de absorção atômica por chama, e produzida a respetiva curva de calibração (Figura 9 e 10).

2.2.2.2.2. Exatidão (Recuperação)

A avaliação da exatidão do método analítico consistiu na fortificação de amostras de mel com diferentes concentrações dos metais pesados em análise. Foram utilizadas três concentrações diferentes, e fortificadas três amostras por cada concentração, resultando

num total de 9 amostras analisadas para cada metal. As concentrações utilizadas foram: para Cu 0,2 µg/ml, 5 µg/ml e 10 µg/ml; para Cd e Pb 0,2 µg/ml, 1 µg/ml e 5 µg/ml. Utilizaram-se três amostras de mel não fortificadas (“branco”).

2.2.2.2.3. Precisão (Repetibilidade)

A repetibilidade para Cu e Pb foi determinada através da fortificação de 6 amostras de mel com a mesma concentração, 5 µg/ml para Cu e 1 µg/ml para Pb. Enquanto que para Cd foram fortificadas 9 amostras, com três concentrações diferentes (0,2 µg/ml, 1 µg/ml e 5 µg/ml), num total de três amostras para cada concentração. Foram preparadas duas amostras sem fortificação (“branco”) para cada metal.

2.2.2.2.4. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção e de quantificação foram determinados pela análise de soluções padrão preparadas no laboratório com concentrações decrescentes dos metais em análise.

2.2.2.2.5. Especificidade

Os métodos espectrofotométricos dão resposta para uma única substância em análise, devido ao uso de lâmpadas específicas que emitem radiação no comprimento de onda característica do elemento (como explicado anteriormente). Para avaliação da especificidade do método analítico para cada metal, prepararam-se soluções padrão e efetuou-se a leitura das soluções.

2.2.3. Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados em Microsoft Office Excel 2007, através do qual se obtiveram os dados de estatística descritiva (média, desvio-padrão, coeficiente de variação, limites mínimos e máximos), gráficos e tabelas.

2.3. Detecção e quantificação de cobre e cádmio em amostras de mel nacional por espectrometria de absorção atômica por chama

2.3.1. Material e métodos

2.3.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram água desionizada e ácido nítrico (J.T. Baker, 6080). A água desionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore®.

2.3.1.2. Equipamentos

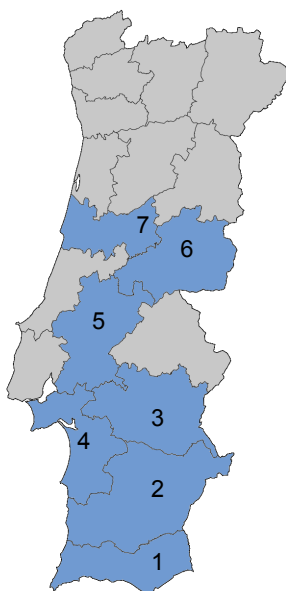
Os equipamentos utilizados foram: balança digital (Precisa 125 A, Max=100 g, 0,0001 mg), estufa (MELAG), muflas (Nabertherm, 30-3000°C), espectrofotômetro de absorção atômica

(Perkin Elmer Analyst 700) com queimador de chama ar/acetileno (17/2 ml/min), lâmpadas de cátodo oco como fonte de emissão e comprimentos de onda de 324,8 nm para Cu e 228,8 nm para Cd.

2.3.1.3. Amostras

Analisaram-se 21 amostras de 7 distritos de Portugal Continental, 3 amostras por distrito (Coimbra, Castelo Branco, Santarém, Évora, Setúbal, Beja e Faro), como ilustrado na Figura 7. O método de amostragem foi por conveniência. As amostras foram obtidas no comércio grossista e diretamente a apicultores nacionais, mantidas nas embalagens de origem e em recipientes de plástico ou vidro. Todas as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz.

Figura 7 - Localização geográfica das amostras de mel analisadas



Legenda: Distritos amostrados (áreas assinaladas a azul): 1 - Faro; 2 - Beja; 3 - Évora; 4- Setúbal; 5 - Santarém; 6 - Castelo Branco; 7 - Coimbra.

2.3.2. Procedimento experimental

2.3.2.1. Preparação da amostra

O método de extração utilizado na preparação das amostras foi o de digestão seca. O procedimento encontra-se descrito no desenvolvimento do método de extração.

2.3.2.2. Quantificação de cobre e cádmio em amostras de mel nacional

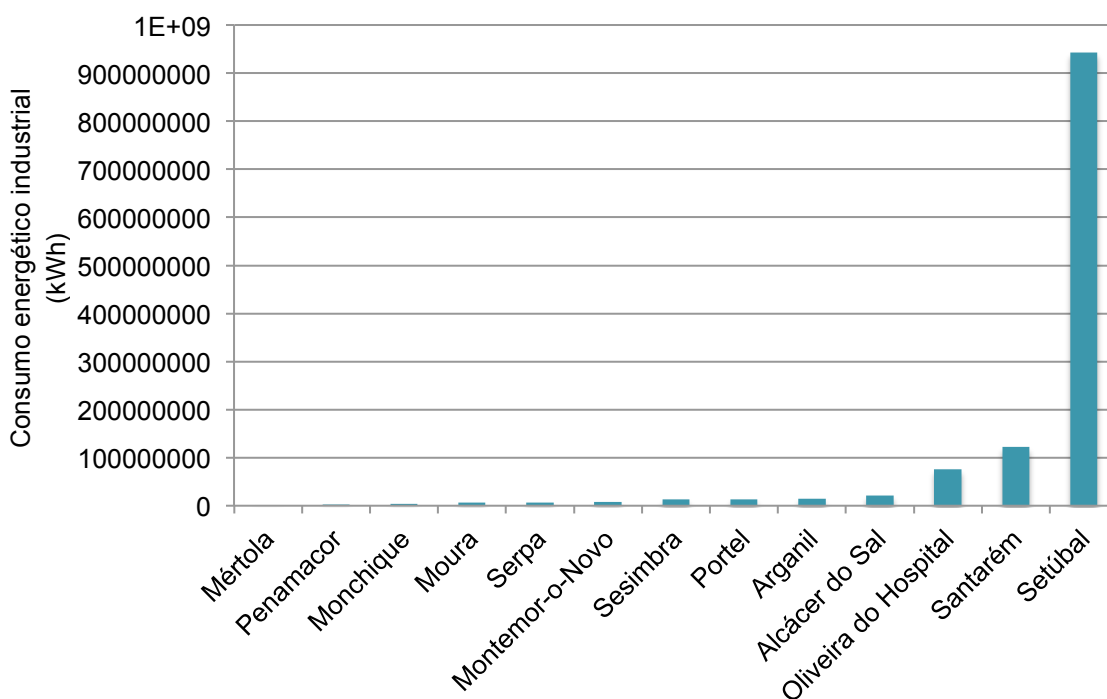
A leitura das amostras realizou-se por espectrometria de absorção atómica por chama e a quantificação dos metais foi efetuada diretamente a partir da curva de calibração elaborada para cada metal (Figura 9 e Figura 10).

2.3.3. Análise estatística

A análise estatística dos resultados consistiu na realização do teste *OneWay Anova* e Teste *t* de Student. Utilizou-se, respetivamente, o programa estatístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e Microsoft Office Excel 2007.

Na análise estatística foram comparadas as concentrações de Cu e Cd determinadas nas amostras com o grau de industrialização dos concelhos, usando como *proxy* o consumo de energia elétrica em 2009 (INE, 2012). A Figura 8 apresenta a distribuição dos consumos nos concelhos de proveniência das amostras estudadas.

Figura 8 - Consumos energéticos (kWh) pela indústria nos concelhos de proveniência das amostras de mel



De acordo com a distribuição dos consumos de energia elétrica as amostras foram divididas em 2 grupos, “industrialização maior” para os três concelhos acima dos 50 milhões de kWh,

Oliveira do Hospital, Santarém e Setúbal, e “industrialização menor” para os concelhos com valores inferiores (Tabela 9).

Tabela 9 - Consumo energético pela indústria (kWh) por concelho no ano de 2009

Concelho (amostra)	Consumo de energia elétrica industrial (kWh) por localização geográfica	Grau de industrialização
Setúbal (Setúbal 1)	942518724	Maior
Sesimbra (Setúbal 2)	12712093	Menor
Alcácer do Sal (Setúbal 3)	20927647	Menor
Arganil (Coimbra 1)	14335666	Menor
Oliveira do Hospital (Coimbra 2; Coimbra 3)	75335808	Maior
Santarém (Santarém 1; Santarém 2; Santarém 3)	121818026	Maior
Penamacor (Castelo Branco 1; Castelo Branco 2; Castelo Branco 3)	2574611	Menor
Montemor-o-Novo (Évora 1; Évora 3)	8186621	Menor
Portel (Évora 2)	13315214	Menor
Mértola (Beja 1)	918069	Menor
Serpa (Beja 2)	6351336	Menor
Moura (Beja 3)	5881311	Menor
Monchique (Faro 1; Faro 2; Faro 3))	3200187	Menor

Legenda: kWh – Kilowatts por hora

Fonte: INE, 2012

3. Resultados e Discussão

3.1. Validação do método espectrofotométrico de absorção atómica por chama para deteção e quantificação de metais pesados (chumbo, cádmio e cobre) em amostras de mel

No desenvolvimento do método de extração, a digestão ácida das amostras revelou-se inadequada para o objetivo pretendido. Em comparação com o método de digestão seca, necessita de uma maior manipulação das amostras, um maior tempo de preparação das mesmas e permite a análise de um reduzido número de amostras simultaneamente. Desta forma, o método de extração escolhido foi o de digestão seca. Os resultados obtidos na validação do método analítico apresentam-se na Tabela 11. Para o Pb, os valores de taxa de recuperação e repetibilidade não foram satisfatórios. Em ambas as determinações os valores de coeficiente de variação foram muito elevados, revelando elevada variabilidade nas leituras efetuadas, quando para a mesma concentração as leituras das amostras

deveriam apresentar variabilidade reduzida (baixo coeficiente de variação). Por conseguinte, a determinação de Pb por espectrometria de absorção atômica por chama nas amostras de mel não foi efetuada. Esta técnica analítica poderá não ser a mais indicada para o tipo de matriz em estudo. A espectrometria de absorção atômica com câmara de grafite será, possivelmente, a técnica de eleição para determinação deste metal pesado em mel. Em relação ao Cu e ao Cd os resultados para parâmetros de validação efetuados encontram-se nas Tabelas 10 e 11.

Figura 9 - Representação gráfica da curva de calibração para cádmio (Linearidade $R^2=0,99$; Equação da reta: $y=0,16235x+0,0015$)

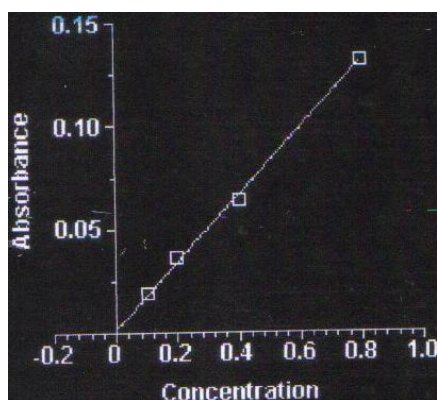


Figura 10 - Representação gráfica da curva de calibração para cobre (Linearidade $R^2=0,99$; Equação da reta: $y=0,03417x+0,0015$)

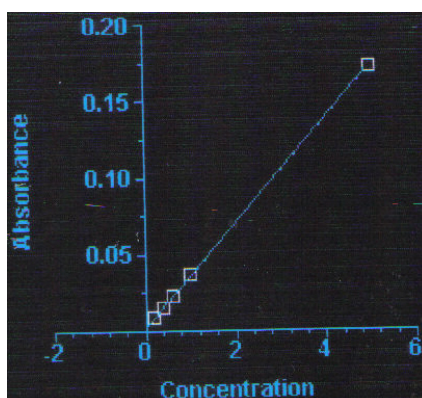


Tabela 10 - Resultados de recuperação para Cu, Cd e Pb

Metal Pesado	Concentração (µg/ml)	Média (µg/ml)	δ (Desvio-padrão)	Coefficiente de variação (%)	Recuperação (%)
Cobre	0,2	0,152	0,015	9	76,25
	5	4,69	0,164	3	93,8
	10	6,97	0,42	6	70,0
	Média				80
Cádmio	0,2	0,185	0,024	13	92,5
	1	0,961	0,003	0,3	96,1
	5	3,585	0,69	19	71,0
	Média				86,5
Chumbo	0,2	0,25	0,07	30	125,0
	1	1,05	0,28	26	105,0
	5	5,87	0,76	13	117,4
	Média				115,8

Tabela 11 - Resultados da validação do método analítico (espectrometria de absorção atômica por chama) para detecção e quantificação de Cu, Cd e Pb

Parâmetros de validação	Metal Pesado		
	Cu	Cd	Pb
Exatidão (recuperação %)	80,0	86,5	115,8
Gama de trabalho (µg/ml)	0,2 - 10	0,2 - 10	0,2 - 10
Linearidade (R^2)	0,99	0,99	0,99
Equação da reta	$y=0,03417x+0,0015$	$y=0,16235x+0,0015$	$y=0,00559x+0,0009$
Precisão (repetibilidade %)	105,3	86,5	129,0
Limite de detecção (µg/ml)	0,1	0,05	_____
Limite de quantificação (µg/ml)	0,2	0,1	_____

3.2. Detecção e quantificação de Cu e Cd em amostras de mel nacional

Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 12. As concentrações médias para Cu são: distrito de Setúbal $1,22 \pm 0,24$ ppm⁴, distrito de Coimbra $0,73 \pm 0,28$ ppm, distrito de Santarém $0,71 \pm 0,89$ ppm, distrito de Castelo Branco $0,65 \pm 0,44$ ppm, distrito de Évora $0,58 \pm 0,35$ ppm, distrito de Beja $0,55 \pm 0,19$ ppm, e distrito de Faro $0,34 \pm 0,28$ ppm. Os resultados obtidos nas amostras analisadas para Cd foram: distrito de Castelo Branco $0,23 \pm 0,06$ ppm, distrito de Setúbal $0,19 \pm 0,04$ ppm; distrito de Évora $0,14 \pm 0,15$ ppm, distrito de Coimbra $0,14 \pm 0,13$ ppm, distrito de Beja $0,07 \pm 0,06$ ppm, o distrito de Faro apresentou valores abaixo do limite de deteção assim como as amostras do distrito de Santarém.

Tabela 12 - Concentração de Cu e Cd em mel nacional de diferentes origens geográficas

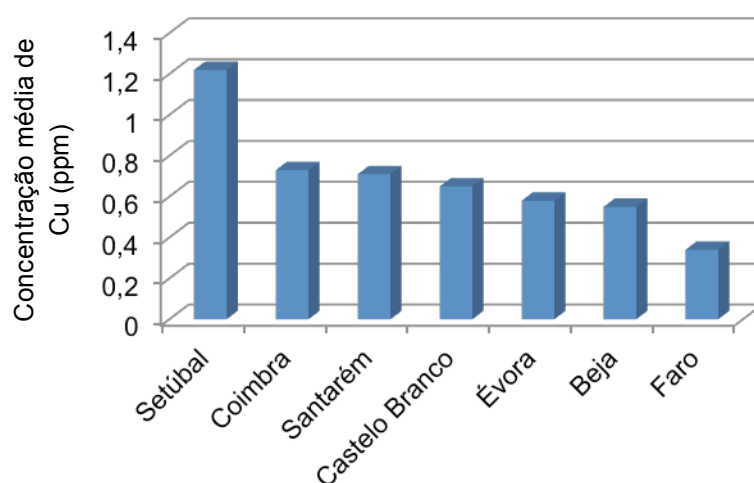
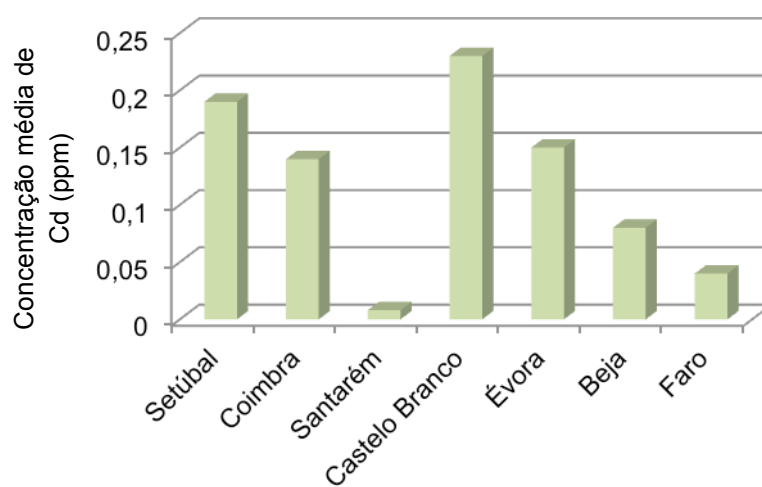
Distrito		Cu (ppm)	Cd (ppm)
Castelo Branco			
	Média	$0,65 \pm 0,44$	$0,23 \pm 0,06$
	Mínimo	0,37	0,19
	Máximo	1,16	0,30
Setúbal			
	Média	$1,22 \pm 0,24$	$0,18 \pm 0,04$
	Mínimo	0,96	0,14
	Máximo	1,43	0,23
Coimbra			
	Média	$0,73 \pm 0,28$	$0,14 \pm 0,13$
	Mínimo	0,43	0,06
	Máximo	0,99	0,29
Faro			
	Média	$0,34 \pm 0,28$	<0,05
	Mínimo	0,09	0,03
	Máximo	0,66	0,04
Beja			
	Média	$0,55 \pm 0,19$	$0,07 \pm 0,06$
	Mínimo	0,38	0,03
	Máximo	0,76	0,15
Évora			
	Média	$0,58 \pm 0,35$	$0,14 \pm 0,15$
	Mínimo	0,22	0,02
	Máximo	0,94	0,31
Santarém			
	Média	$0,71 \pm 0,89$	<0,05

⁴ ppm=mg/kg

Tabela 12 (Continuação)

Mínimo	0,03	0
Máximo	1,72	0,02

Assim, a concentração de Cu nas amostras variou entre 0,03 e 1,72 ppm e a de cádmio entre 0 e 0,30 ppm. A concentração de cobre mais elevada foi detetada nas amostras do distrito de Setúbal, seguindo-se as amostras do distrito de Coimbra, Santarém, Castelo Branco, Évora, Beja e Faro (Figura 11). As amostras de mel do distrito de Castelo Branco apresentaram o nível mais elevado de cádmio, seguindo-se Setúbal, Évora, Coimbra, Beja, Faro e Santarém (Figura 12).

Figura 11 - Concentração média de Cu (ppm) em amostras de mel nacional de diferentes origens geográficas**Figura 12 - Concentração média de Cd (ppm) em amostras de mel nacional de diferentes origens geográficas**

As concentrações de Cd detetadas nas amostras analisadas são inferiores às reportadas por Erbilir *et al.* (2005) em mel turco, 0,32 mg/kg. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho experimental são superiores aos obtidos por Raeymaekers (2006) em mel de origem alemã (0,001 - 0,09 mg/kg). O direito nacional e o direito comunitário não estabelecem teores máximos de Cd em mel. O *Codex Alimentarius* em *Standard for honey* (1981), revisto em 2001, também não estabelece limites máximos de metais pesados em mel. O Regulamento (CE) nº 1881/2006 de 19 de Dezembro estabelece limites máximos de Cd noutros géneros alimentícios, variando estes entre 0,05 e 1,0 mg/kg. Os valores de Cd detetados encontram-se dentro desses limites.

Os níveis de Cu obtidos em mel nacional são semelhantes aos observados por Garcia *et al.* (2006) em mel galego, 0,8 mg/kg, e aos obtidos por Raeymaekers (2006) em mel de origem alemã, 0,04 - 1,0 mg/kg. Já outros autores (Frias *et al.*, 2007; Saif-ur-Rehman *et al.*, 2008), detetaram valores superiores em mel de origem espanhola (ilha de Tenerife) e paquistanesa respetivamente, 1,28 mg/kg e 1,75 mg/kg, aproximando-se estes valores dos detetados no distrito de Setúbal. A EFSA estabeleceu a dose diária recomendada de Cu num adulto em 5 mg. Considerando que o consumo anual de mel *per capita* em Portugal é de 0,7 kg (INE, 2011), os valores encontrados neste estudo revelam que o mel é um alimento seguro, e que o seu consumo não constitui perigo. Os níveis de Cu obtidos neste trabalho não representam risco para a saúde pública.

3.3. Comparação dos resultados entre as diferentes regiões de Portugal

A análise estatística dos resultados consistiu na realização do teste *OneWay Anova* e Teste t de Student.

A comparação estatística das médias de Cd obtidas revelaram não existirem diferenças significativas entre si ($p > 0,05$) (Tabela 13), verificando-se o mesmo para o valor de p quando analisadas as concentrações de Cu (Tabela 14).

Tabela 13 - Análise de variância com um fator de variação (*OneWay Anova*) para Cd

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados Médios	F	P
Entre grupos	,116	6	,019	2,615	,065
Dentro de grupos	,104	14	,007		
Total	,220	20			

Tabela 14 - Análise de variância com um fator de variação (OneWay Anova) para Cu

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	P
Entre grupos	1,308	6	,218	1,110	,405
Dentro de grupos	2,748	14	,196		
Total	4,056	20			

Embora não se encontrem diferenças significativas entre as médias de origens diferentes (distritos), importa avaliar as diferenças encontradas dentro de cada distrito, e entre as 21 amostras. De facto, verificou-se que as concentrações de Cd em determinados distritos, como Évora e Coimbra, apresentam uma maior amplitude de valores, enquanto noutros verificou-se constância dos valores determinados, como no distrito de Faro (Figura 13). Na Figura 14 podemos também avaliar as variações nas concentrações de Cu. No distrito de Santarém verificaram-se variações significativas entre as três amostras analisadas.

Figura 13 - Concentração média de Cd (ppm) nas 21 amostras analisadas

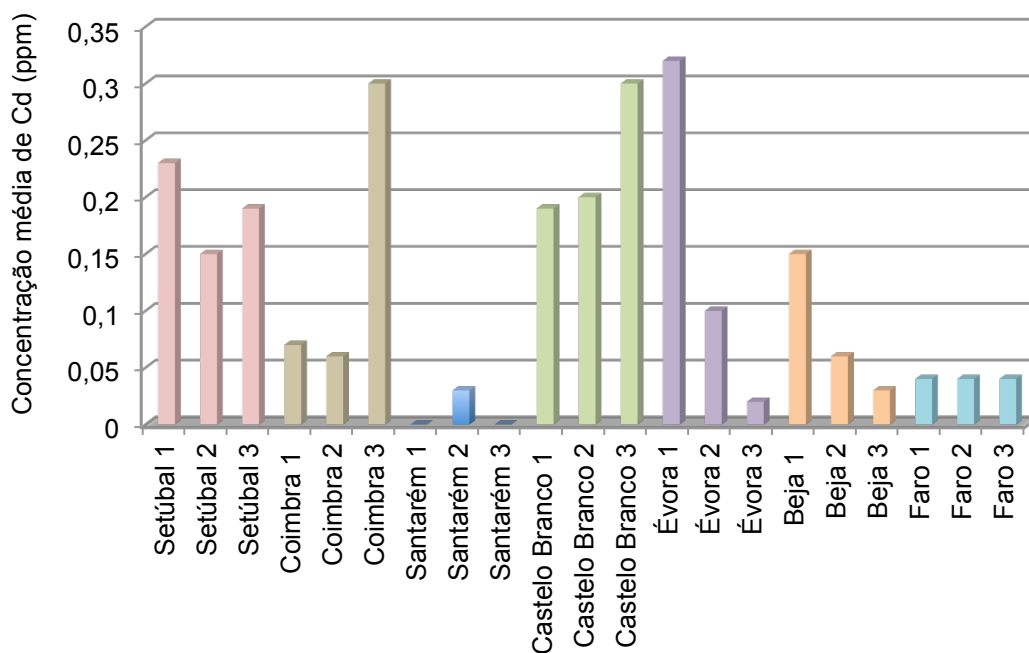
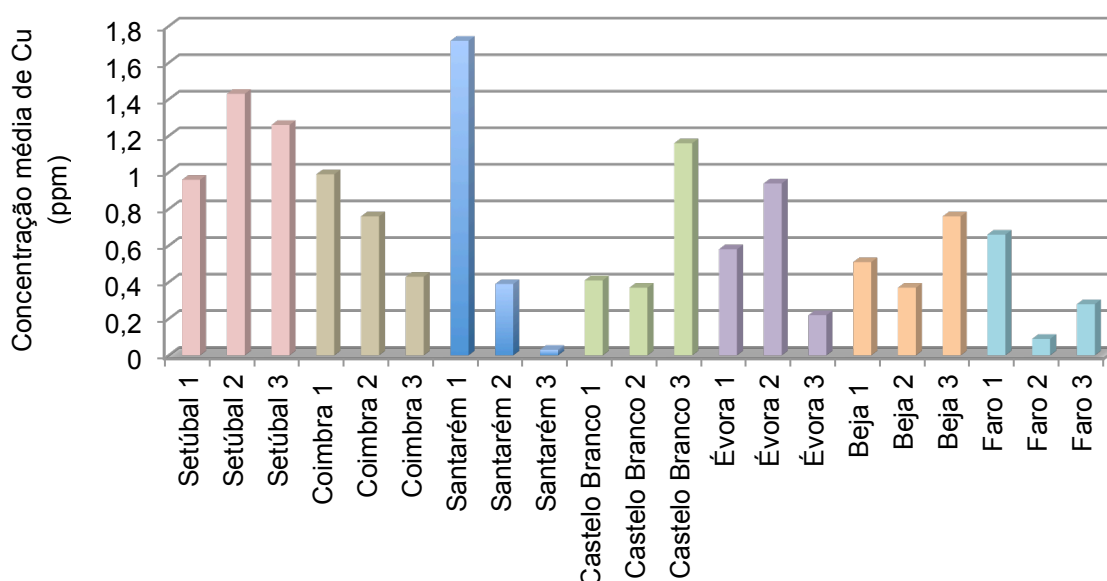


Figura 14 - Concentração média de Cu (ppm) nas 21 amostras analisadas



A análise estatística dos resultados pretendeu também avaliar se as concentrações encontradas estariam diretamente relacionadas com o grau de industrialização dos concelhos amostrados, uma vez que a origem destes contaminantes poderá ser industrial. O grau de industrialização foi atribuído como “maior” ou “menor” de acordo com a distribuição do consumo de energia elétrica pela indústria em cada concelho como já apresentado em materiais e métodos. A diferença entre as médias de Cu e Cd nos dois grupos foi avaliada através do teste estatístico t de Student (Tabela 15 e Tabela 16).

Os resultados para Cu demonstraram que não existem diferenças significativas entre os dois grupos de amostras ($p=0,84$), verificando-se também um valor p superior a 0,05 no teste aplicado às concentrações médias de Cd ($p=0,65$).

Tabela 15 - Teste t de Student para valores de cobre em dois grupos de amostras (industrialização “maior” e industrialização “menor”)

Cobre	Industrialização maior	Industrialização menor
Média	0,715	0,669
Variância	0,346	0,165
Número da amostra	6	15
Variância ponderada	0,212	
Graus de liberdade	19	
Estatística t	0,204	
Valor de p bicaudal	0,840	
t crítico bicaudal	2,093	

Tabela 16 - Teste t de Student para valores de cádmio em dois grupos de amostras (industrialização “maior” e industrialização “menor”)

Cádmio	Industrialização maior	Industrialização menor
Média	0,102	0,125
Variância	0,016	0,009
Número da amostra	6	15
Variância ponderada	0,011	
Graus de liberdade	19	
Estatística t	-0,450	
Valor de p bicaudal	0,657	
t crítico bicaudal	2,093	

Os resultados obtidos no teste t de Student demonstram não existir relação entre o grau de industrialização dos concelhos amostrados e as concentrações médias de Cu e Cd detetadas. Os valores de p determinados revelam que, provavelmente, a presença de Cu e Cd nas amostras não resultou de contaminação industrial ou que o critério utilizado para classificação dos concelhos (consumo energético industrial) não foi o mais adequado, já que nem todas as indústrias produzem ou emitem estes metais. Por outro lado, dentro dos distritos mais industrializados existirão zonas com maior ou menor proximidade ao tecido industrial e assim com diferente probabilidade de contaminação por metais pesados. A localização dos apiários de origem das amostras não é conhecida pelo que não é possível inferir do risco de contaminação dos locais utilizados pelas abelhas. Acresce-se ainda que o reduzido tamanho da amostra não permite que se tenha confiança nestes resultados. No entanto, o tamanho da amostra cumpriu os requisitos da Decisão da Comissão nº 97/747/CE de 27 de Outubro. Embora não tenha sido encontrada uma relação entre fontes de poluição e as concentrações de metais das amostras analisadas, importa salientar que os resultados apresentados neste trabalho acrescem importantes informações acerca da contaminação do mel produzido em território nacional. Os controlos oficiais, da responsabilidade da DGAV e da União Europeia, revelam não existirem elementos químicos (metais pesados) nas amostras de mel nacional analisadas entre 2006 e 2010. No entanto, os resultados deste trabalho alertam que estes compostos estão presentes na composição do mel nacional, apesar de os seus valores de concentração se encontrarem abaixo dos limites recomendados para outros produtos de origem animal.

CAPITULO - III. CONCLUSÕES

As abelhas e os seus produtos, como o mel, vêm sendo considerados bioindicadores ambientais. Diversos autores têm detetado a presença de metais pesados em mel de diferentes origens. Em Portugal, a poluição ambiental poderá também alterar a composição de alimentos produzidos na natureza, considerados até então naturais e seguros. A proteção do consumidor obriga a uma monitorização apertada dos alimentos, e à verificação das suas qualidades nutricionais.

Neste trabalho experimental a metodologia utilizada para preparação da amostra, método de digestão seca, revelou-se a mais adequada. No que respeita à deteção e quantificação de metais pesados, a técnica de espectrometria de absorção atómica por chama permitiu uma análise fiel nos casos do cádmio e do cobre mas revelou algumas limitações na quantificação do chumbo.

Os resultados obtidos neste estudo, que analisou 21 amostras de 7 distritos diferentes, demonstram que na composição do mel nacional estão presentes metais pesados (cádmio e cobre), com variações de concentração entre e dentro dos concelhos, mas estas diferenças não foram estatisticamente significativas. A contaminação do mel analisado pode ter decorrido de fatores naturais ou de fatores antropogénicos. Importa perceber que determinados metais, como o cádmio, surgem sobretudo da atividade industrial e que isso pode determinar a sua concentração final no mel. Por outro lado, a presença destes metais em concentrações elevadas em determinadas amostras pode resultar de práticas apícolas negligentes, já que não se verificaram diferenças significativas entre as amostras de diferentes zonas geográficas, nem foi encontrada nenhuma relação entre o grau de industrialização dos concelhos e os resultados obtidos. Existe também a possibilidade da existência de fatores naturais que determinem as diferenças verificadas.

Importa referir também que a amostra analisada era de reduzida dimensão, como tal a representação das diferentes regiões pode ser insuficiente. Por outro lado, o indicador de industrialização utilizado na análise estatística (consumo energético industrial) pode não assinalar corretamente as indústrias com emissões destes metais pesados.

A produção deste tipo de alimentos deverá, na sociedade moderna e industrializada, obedecer a novas regras, contribuindo para a manutenção das suas características naturais. Atualmente, a legislação nacional estabelece que os apiários devem encontrar-se a mais de 50 metros da via pública e a mais de 100 metros de qualquer outra edificação em utilização. As distâncias estabelecidas no Decreto-Lei nº 203/2005 poderão não ser suficientes para

proteção dos apiários, e consequentemente do mel produzido. A contaminação dos alimentos por metais pesados põem em risco a saúde dos consumidores, devido aos seus efeitos bio acumulativos. São inúmeros os efeitos negativos documentados: anemia, insuficiência hepática e renal, alterações do sistema nervoso e do tecido ósseo. Atualmente, inúmeros estudos tentam demonstrar o papel dos metais pesados na gênese de várias patologias das sociedades modernas, como o cancro e as doenças neurodegenerativas. Os resultados e conclusões destes estudos parecem indicar nesse sentido. Assim, é de cardeal importância monitorizar e controlar estes elementos no entorno do ser humano, nomeadamente e principalmente nos alimentos, para que o seu impacto na saúde de todos seja minimizado. O aparecimento no mercado de produtos certificados e resultantes do modo de produção biológica demonstram existir uma preocupação de melhoramento deste alimento por parte dos seus produtores. Face a uma tendência crescente do chamado mercado biológico, é de interesse tanto do consumidor como do produtor apostar em produtos de elevada qualidade, livres de compostos comprovadamente nocivos. O envolvimento de associações de produtores neste tipo de estudos demonstra o interesse na procura de um produto de excelência que reúna as condições ótimas para consumo.

BIBLIOGRAFIA

- Adriano, D. C. (1992). *Biogeochemistry of trace metals* (1st ed.). Lewis Publishers.
- Agência Portuguesa do Ambiente (2011). *Emissões de poluentes atmosféricos por concelho 2009*. Acedido em Jan. 9, 2012, disponível em http://www.apambiente.pt/politicassambiente/Ar/InventarioNacional/Documents/Emissoes_Concelho_20111109.pdf.
- Agrawal, S. B. & Agrawal, M. (1999). *Environmental pollution and plant responses* (1st ed.). Lewis Publishers.
- Akesson, A., Lundh, T., Vahter, M., Bjellerup, P., Lidfeldt, J., Nerbrand, C., Samsioe, G., Stromberg, U. & Skerfving, S. (2005). Tubular and glomerular kidney effects in Swedish women with low environmental cadmium exposure. *Environmental Health Perspectives*, 113(11), 1627-1631.
- Almeida, C. M. V. B. (2010). *Detecção de contaminantes no mel*. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Al-Waili, N., Salom, K. & Al-Ghamdi, A. A. (2011). Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice. *The Scientific World Journal*, 11, 766-787.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., González, M., Speisky, H. & Uauy, R. (2003). Gastrointestinal symptoms and blood indicators of copper load in apparently healthy adults undergoing controlled copper exposure. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 646-50.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (2009). *Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal*. Acedido em Jan. 3, 2012, disponível em <http://www.fipa.pt/userfiles/file/i005411.pdf>.
- Belas, A. (2012). *Resíduos de medicamentos veterinários em mel*. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Bhattacharyya, M. H. (2009). Cadmium osteotoxicity in experimental animals: mechanisms and relationship to human exposures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 258-265.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, 1-18.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Buldini, P. L., Cavalli, S., Mevoli, A. & Sharma, J. L. (2001). Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. *Food Chemistry*, 73, 487-495.
- Čelechovská, O. & Vorlová, L. (2001). Groups of honey – Physicochemical properties and heavy metals. *Acta Veterinaria Brno*, 70, 91-95.
- Chen, Y. W., Yang, C. Y., Huang, C. F., Hung, D. Z., Leung, Y. M. & Liu, S. H. (2009). Heavy metals, islet function and diabetes development. *Islets*, 1(3), 169-176.

- Cockell, K. A., Bertinato, J. & LÁbbé, M. R. (2008). Regulatory frameworks for copper considering chronic exposures of the population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(suppl), 863S-6S.
- Comissão Europeia (2008a). European comission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2006. Acedido em Maio, 28, 2012, disponível em http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2006_en.pdf
- Comissão Europeia (2008b). European comission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2007. Acedido em Maio, 28, 2012, disponível em http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf
- Comissão Europeia (2010a). European comission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2008. Acedido em Maio, 28, 2012, disponível em http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2008_en.pdf
- Comissão Europeia (2010b). European comission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2009. Acedido em Maio, 28, 2012, disponível em http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2009_en.pdf
- Comissão Europeia (2012). European commission staff working document on the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2010. Acedido em Maio, 28, 2012, disponível em http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2010_en.pdf
- Conti, M. E. & Botrè, F. (2001) Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 69, 267-282.
- Decisão da Comissão nº 97/747/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro, JO L 303 de 06.11.1997, p.12-15
- Decreto-Lei nº 148/99 de 4 de Maio. Diário da República nº 103 - Série I-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Decreto-Lei nº 186/99 de 31 de Maio. Diário da República nº 126 - Série I-A. Ministério da Economia.
- Decreto-Lei nº 37/2000 de 14 de Março. Diário da República nº 62 - Série I-A. Ministério da Agricultura , do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Decreto-Lei nº 104/2000 de 3 de Junho. Diário da República nº 129 - Série I-A. Ministério da Economia.
- Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro. Diário da República nº 216 - Série I-A. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas.
- Decreto-Lei nº 185/2005 de 4 de Novembro. Diário da República nº 212 - Série I-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Decreto-Lei nº 203/2005 de 25 de Novembro. Diário da República nº 227 - Série I-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Decreto-Lei nº 118/2006 de 21 de Junho. Diário da República nº 118 - Série I-A. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional.
- Decreto-Lei nº 89/2008 de 30 de Maio. Diário da República nº 104 - Série I. Ministério da Economia e da Inovação.

- Decreto-Lei nº 102/2010 de 23 de Setembro. Diário da República nº 186 - Série I. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território.
- Dias, L. A., Peres, A. M., Correia, D. M., Vilas-Boas, M. (2008). Níveis de contaminação de antibióticos em mel de três anos apícolas. Acedido em Junho, 3, 2012, disponível em www.fnap.pt/projectos.pnp?m=1
- Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (2006). *Plano nacional de controlo de resíduos 2006 – resultados*. Lisboa: MADRP. Acedido em Jan. 12, 2012, disponível em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667466&generico=150515&cboui=150515>
- Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (2007). *Plano nacional de controlo de resíduos 2007 – resultados*. Lisboa: MADRP. Acedido em Jan. 12, 2012, disponível em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667466&generico=150515&cboui=150515>
- Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (2008). *Plano nacional de controlo de resíduos 2008 – resultados*. Lisboa: MADRP. Acedido em Jan. 12, 2012, disponível em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667466&generico=150515&cboui=150515>
- Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (2009). *Plano nacional de controlo de resíduos 2009 – resultados*. Lisboa: MADRP. Acedido em Jan. 12, 2012, disponível em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667466&generico=150515&cboui=150515>
- Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária (2010). *Plano nacional de controlo de resíduos 2010 – resultados*. Lisboa: MADRP. Acedido em Maio 30, 2012, disponível em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=3667466&generico=150515&cboui=150515>
- Diretiva nº 96/22/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, JO L 125 de 23.05.1996, p.0003-0009.
- Diretiva nº 96/23/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, JO L 125 de 23.05.1996, p.0010-0032.
- Diretiva nº 98/70/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 13 de Outubro, JO L 350 de 28.12.1998, p.0058-0068.
- Diretiva nº 2003/22/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro, JO L 262 de 14.10.2003, p.0017-0021.
- Diretiva nº 2004/107/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Dezembro, JO L 023 de 26.1.2005, p.3-16.
- Diretiva nº 2008/1/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Janeiro, JO L 024 de 29.1.2008, p.8-29.
- Diretiva nº 2008/50/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 21 de Maio, JO L 152 de 11.6.2008, p.1-44.
- Desai, V. & Kaler, S.G. (2008). Role of copper in human neurological disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(suppl), 855S-8S.
- Duarte, L. (2000). Epidemiovigilância dos resíduos no mel (nota de revisão). *Veterinária Técnica*, 10(2), 20-28.

- Edwards, J. R. & Prozialeck, W. C. (2009). Cadmium, diabetes and chronic kidney disease. *Toxicology Applied Pharmacology*, 238(3), 289-293.
- Erbilir, F. & Erdoğan, Ö. (2005). Determination of heavy metals in honey in Kahramanmaraş City, Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 109, 181-187.
- European Environmental Agency (2011a). *Air pollutant emissions data viewer*. Acedido em Set. 10, 2011, disponível em <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/data-viewers/air-emissions-viewer-lrtap>.
- European Environmental Agency (2011b). *Data and maps: heavy metal (HM) emissions*. Acedido em Set. 21, 2011, disponível em <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/eea32-heavy-metal-hm-emissions-1/assessment>.
- European Food Safety Authority (2006). Scientific committee on food. Scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies. *Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals*. Acedido em Maio 2, 2011, disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf>.
- European Food Safety Authority (2009). Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the European Commission on cadmium in food. *The EFSA Journal*, 980, 1-139.
- European Food Safety Authority (2010). EFSA panel on contaminants in food chain (CONTAM); Scientific opinion on lead in food. *The EFSA Journal*, 8(4), 1570-1717.
- European Food Safety Authority (2011). EFSA panel on contaminants in the food chain (CONTAM); Scientific opinion on tolerable weekly intake for cadmium. *The EFSA Journal*, 9(2), 1975-1994.
- European Medicines Agency (2011). VICH GL49: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. Acedido em Jun., 2, 2012, disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105053.pdf
- European Medicines Agency (1995). International Conference on Harmonization: validation of analytical procedures – text and methodology. Acedido em Nov., 29, 2011, disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002662.pdf
- Ferraro, P. M., Costanzi, S., Naticchia, A., Sturniolo, A. & Gambaro, G. (2010). Low level exposure to cadmium increases the risk of chronic kidney disease: analysis of the NHANES 1999-2006. *BMC Public Health*, 10, 304-312.
- Ferrer, B. S., Rodriguez, G. O., Peña, J., Martínez, J. & Morán, M. (2004). Mineral content of honey produced in Zulia state. Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(3).
- Ferris, J., Berbel, O., Garcia, J., López, J. A., Sobrino-Najul, E. & Ortega, J. A. (2011). Factores de riesgo ambientales no dietéticos en el cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 35(5), 289-95.
- Fredes, C. & Montenegro, G. (2006). Heavy metals and other trace elements contents in Chilean honey. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33(1), 50-58.
- Frías, I., Rubio, C., González-Iglesias, T., Gutiérrez, A. J., González-Weller, D. & Hardisson, A. (2008). Metals in fresh honeys from Tenerife Island, Spain. *Bulletim of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 30-33.
- Fuentealba, C. & Aburto, E.M. (2003). Animal models of copper-associated liver disease. *Comparative Hepatology*, 2(5).

- Gabinete de Planeamento e Políticas (2010a). Programa apícola nacional – Triénio 2011-2013. Acedido em Nov. 28, 2011, disponível em <http://www.gpp.pt/MA/apicultura/>.
- Gabinete de Planeamento e Políticas (2010b). *Estatísticas e análises: estatísticas da agricultura biológica*. Acedido em Nov. 28, 2011, disponível em www.gpp.pt.
- Gallagher, C. M., Kovach, J. S. & Meliker, J. R. (2008). Urinary cadmium and osteoporosis in U.S. women ≥ 50 years of age: NHANES 1988-1994 and 1999-2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(10), 1338-1343.
- Gallagher, C. M., Chen, J. J. & Kovach, J. (2010). Environmental cadmium and breast cancer risk. *Aging*, 1(11), 804-814.
- Garcia, J. C. R., Rodriguez, R. I., Crecente, R. M. P., Garcia, J. B., Martin, S. G. & Latorre, C. H. (2006). Preliminary chemometric study on the use of honey as an environmental marker in Galicia (Northwestern Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7206-7212.
- He, Z. L., Yang, X. E. & Stoffella, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 125-140.
- Huster, D. (2010). Wilson disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 24, 531-539.
- International Agency for Research on Cancer (1997). *Cadmium and cadmium compounds*. Acedido em Abril 13, 2011, disponível em <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol58/mono58-2.html>.
- International Agency for Research on Cancer (2006). *Inorganic and organic lead compounds*. Acedido em Abril 13, 2011, disponível em <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol87/volume87.pdf>.
- Instituto Nacional de Estatística (2011). *Base de dados estatísticos*. Acedido em Nov. 26, 2011, disponível em http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_pesquisa&frm_acciao=PESQUISAR&frm_show_page_num=1&frm_modulo_pesquisa=PESQUISA_SIMPLES&frm_modulo_texto=MODO_TEXTO_ALL&frm_texto=mel.
- Instituto Nacional de Estatística (2012). *Base de dados estatísticos - estatísticas territoriais*. Acedido em Março 13, 2012, disponível em http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_unid_territorial&menuBOUI=13707095&contexto=ut&selTab=tab3.
- Ioannidou M. D., Zachariadis, G. A., Anthemidis, A. N. & Stratis, J. A. (2004). Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, 65(1), 92-97.
- Irish, J., Blair, S. & Carter, D. A. (2011). The antibacterial activity of honey derived from Australian flora. *PLoS ONE*, 6(3), e18229.
- Jones, K. C. (1987). Honey as an indicator of heavy metal contamination. *Water, Air, and Soil Pollution*, 33, 179-189.
- Lönnerdal, B. (2008). Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(suppl): 846S-50S.
- Martinho, M. R. (1988). *A criação de abelhas*. Rio de Janeiro: Publicações Globo Rural.
- McElroy, J. A., Shafer, M. M., Trentham-Dietz, A., Hampton, J. M. & Newcomb, P. A. (2006). Cadmium exposure and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(12), 869-873.

- Mendham, J., Denney, R.C., Barnes, J. D. & Thomas, M. (2002). *Vogel – Análise química quantitativa* (6ª edição). Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A.
- Menke, A., Muntner, P., Silbergeld, E. K., Platz, E. A. & Guallar, E. (2009). Cadmium levels in urine and mortality among U.S. adults. *Environmental Health Perspectives*, 117(2), 190-196.
- Navas-Acien, A., Tellez-Plaza, M., Guallar, E., Muntner, P., Silbergeld, E., Jaar, B. & Weaver, V. (2009). Blood cadmium and lead and chronic kidney disease in US adults: a joint analysis. *American Journal of Epidemiology*, 170(9), 1156-1164.
- Nawrot, T., Plusquin, M., Hogerorst, J., Roels, H. A., Celis, H., Thijs, L., Vangronsveld, J., Hecke, E. V. & Staessen, J. A. (2006). Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *The Lancet Oncology*, 7, 119-26.
- Neves, A. M. G. S. (2006). *Manual de boas práticas na produção de mel: princípios gerais de aplicação*. Lisboa: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal.
- Perugini, M., Manera, M., Grotta, L., Abete, M.C., Tarasco, R. & Amorena, M. (2010). Heavy metal (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biological Trace Element Research*, 140(2), 170-176.
- Pizarro, F., Olivares, M., Araya, M., Gidi, V. & Uauy, R. (2001). Gastrointestinal effects associated with soluble and insoluble copper in drinking water. *Environmental Health Perspectives*, 109(9), 949-952.
- Pohl, P. (2009). Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(1), 117-128.
- Porrini, C., Sabatini, A. G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E. & Celli, G. (2003). Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. *Apiacta*, 38, 63-70.
- Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Nebert, D. W., Woods, J. M., Barchowsky, A. & Atchison, W. D. (2008). The vascular system as a target of metal toxicity. *Toxicological Sciences*, 102(2), 207-218.
- Przybylowski, P. & Wilczynska, A. (2001). Honey as an environmental marker. *Food Chemistry*, 74, 289-291.
- Raeymaekers, B. (2006). A prospective biomonitoring campaign with honey bees in a district of Upper-Bavaria (Germany). *Environmental Monitoring and Assessment*, 116, 233-243.
- Regulamento (CE) nº 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, JO L 139 de 30.4.2004, p.1-54.
- Regulamento (CE) nº 501/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Março, JO L 91 de 29.3.2006, p.8-9.
- Regulamento (CE) nº 1881/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 19 de Dezembro, JO L 364 de 20.12.2006, p.5-24.
- Regulamento (CE) nº 834/2007 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Junho de 2007, JO L 189 de 20.7.2007, p.1-37.
- Ribeiro, M., Matos, A., Almeida, A., Fonseca, A., Fernandes, B., Mota, C., Gonçalves, E., Garcia, E., Pereira, E., Garção, H., Guedes, H., Rodrigues, M., Neto, M. & Abreu, R. (2009). Produtos alimentares tradicionais: hábitos de compra e consumo do mel. *Revista de Ciências Agrárias*, 97-112.
- Roberts, E. A. & Sarkar, B. (2008). Liver as a key organ in the supply, storage and excretion of copper. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(suppl), 851S-4S.

- Sadhra, S. S., Wheatley, A. D. & Cross, H. J. (2007). Dietary exposure to copper in the European union and its assessment for EU regulatory risk assessment. *Science of the Total Environment*, 374, 223-234.
- Sair-ur-Rehman, Khan Z. F. & Maqbool, T. (2008). Physical and spectroscopic characterization of Pakistani honey. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(2), 199-204.
- Saridaki-Papakonstadinou, M., Andredakis, S., Burriel, A. & Tsachev, I. (2006). Determination of tetracycline residues in Greek honey. *Trakia Journal of Science*, 1(4), 33-36.
- Satarug, S. & Moore, M. R. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1099-1103.
- Schutte, R., Nawrot, T. S., Richart, T., Thijs, L., Vanderschueren, D., Kuznetsova, T., Hecke, E. V., Roels, H. A. & Staessen, J. A. (2008). Bone resorption and environmental exposure to cadmium in women: a population study. *Environmental Health Perspectives*, 116(6), 777-782.
- Shannon, M. W., Borron, S. W. & Burns, J. M. (2007). *Haddad and Winchester's Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose* (4th ed.). Saunders.
- Shwartz, G. G., Il'yasova, D. & Ivanova, A. (2003). Urinary cadmium, impaired fasting glucose and diabetes in the NHANES III. *Diabetes Care*, 26 (2), 468-470.
- Serra, M. C. C. (2011). *As Propriedades antioxidantes do mel*. Acedido a Jun., 2, 2012, disponível em <http://www.oapicultor.com/artigos/Propriedades%20anti%20Oxidante.pdf>
- Stankovska, E., Stafilov, T. & Šajn, R. (2008). Monitoring of trace elements in honey from the Republic of Macedonia by atomic absorption spectrometry. *Environmental, Monitoring and Assessment Journal*, 142, 117-126.
- Tchounwou, P. B., Newsome, C., Williams, J. & Glass, K. (2008). Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG(2)) cells. *Metal Ions in Biology and Medicine*, 10, 285-290.
- Thomas, L.D.K., Hodgson, S., Nieuwenhuijsen, M. & Jarup, L. (2009). Early kidney damage in a population exposed to cadmium and other heavy metals, *Environmental Health Perspectives*, 117(2), 181-184.
- Uauy, R., Maass, A., & Araya, M. (2008). Estimating risk from copper excess in human populations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(suppl), 867S-71S.
- Vilas-Boas, M. (2008). *Manual de apicultura em modo de produção biológico*. Lisboa: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal. Acedido em Jun., 1, 2012, disponível em http://www.fnap.pt/gestor/downloads/doc_7.pdf
- Vonk, W.I.M., Wijmenga, C. & Sluis, B. (2008). Relevance of animal models for understanding mammalian copper homeostasis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(suppl), 840S-5S.
- Weiss, B. (2010). Lead, manganese, and methylmercury as risk factors for neurobehavioral impairment in advanced age. *International Journal of Alzheimers Diseases*, article ID 607543.
- World Health Organization (1981). *WHO/FAO Food Standards. Codex Alimentarius. Standards for honey*. Acedido em Agosto 15, 2011, disponível em http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp.
- World Health Organization (1998). *Copper - Environmental health criteria 200*. Acedido em Maio 5, 2011, disponível em www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm.

- World Health Organization (2000). *Safety Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-third meeting of the joint FAO/WHO expert committee on food additives: Lead*. Acedido em Abril 10, 2011, disponível em <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec12.htm>.
- World Health Organization (2004a). *Copper in drinking-water - WHO guidelines for drinking-water quality*. Acedido em Maio 7, 2011, disponível em http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/copper.pdf
- World Health Organization (2004b). *Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-first report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*. Acedido em Maio 7, 2011, disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/924166052x.pdf>
- World Health Organization (2011). *Evaluation of certain food additives and contaminants. Seventy-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*. Acedido em Nov. 25, 2011, disponível em http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_960_eng.pdf.

ANEXOS

Anexo I – Resumo referente ao poster apresentado no V Congresso da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias

Determinação de metais pesados em amostras de mel por Espectrometria de Absorção Atómica: resultados preliminares

Pereira, A. F., Belas, A., Carrapiço, B., Vaz, Y.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

O mel é constituído por hidratos de carbono, proteínas, aminoácidos, água, vitaminas e minerais. É um alimento nutritivo, com conhecidas propriedades antivirais, antimicrobianas e antioxidantes e consumido por crianças, adultos e idosos. A produção de mel ocorre em meio natural, estando o produto sujeito à contaminação por diversos poluentes ambientais.

Uma das principais preocupações relativas à contaminação do mel é a presença de metais pesados de origem natural ou antropogénica, sendo esta última a mais importante. As principais fontes destes contaminantes são as emissões industriais, sobretudo da indústria metalúrgica e incineração de resíduos, bem como a aplicação de fertilizantes agrícolas.

O objectivo deste trabalho consistiu na determinação de metais pesados (Cu, Cd) em amostras de mel nacional de diferentes origens geográficas por espectrometria de absorção atómica.

A determinação foi realizada em espectrofotómetro de absorção atómica (Perkin Elmer Analyst 700) com queimador de chama ar/acetileno (17/2 ml/min) e com lâmpadas de cátodo oco como fonte de emissão. Para validação da metodologia analítica avaliaram-se os seguintes parâmetros: linearidade, repetibilidade, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação. Na validação do método foram obtidas recuperações superiores a 80%, repetibilidade acima de 85%, linearidade de $R^2=0,99$, limites de quantificação e de detecção para Cd de 0,1 e 0,05 ppm e para Cu de 0,2 e 0,1 ppm.

Analysaram-se 21 amostras de 7 distritos de Portugal Continental (3 amostras distintas por distrito). As concentrações médias para Cu e para o Cd foram, respectivamente: distrito de Castelo Branco, $0,65 \pm 0,44$ ppm e $0,23 \pm 0,06$ ppm; distrito de Setúbal, $1,22 \pm 0,24$ ppm e $0,19 \pm 0,04$ ppm; distrito de Coimbra, $0,73 \pm 0,28$ ppm e $0,14 \pm 0,13$ ppm; distrito de Faro, $0,34 \pm 0,28$ ppm e valores abaixo do limite de detecção para Cd; distrito de Beja, $0,55 \pm 0,19$ ppm e $0,07 \pm 0,06$ ppm; distrito de Évora, $0,58 \pm 0,35$ ppm e $0,14 \pm 0,15$ ppm; distrito de

Santarém, $0,71 \pm 0,89$ ppm e para Cd valores abaixo do limite de detecção. Estatisticamente não existem diferenças significativas ($p>0,05$) entre os resultados.

O Regulamento (CE) nº 1881/2006 estabelece teores máximos de Cd em diferentes géneros alimentícios, sem definir limites para o mel. Os valores médios permitidos encontram-se entre 0,05 e 1,0 mg/kg. Para Cu não existem teores máximos permitidos em mel, ou qualquer outro género alimentício, sendo que a dose máxima diária recomendada de Cu num adulto é de 5 mg. Os resultados obtidos neste trabalho não ultrapassam os limites estabelecidos.